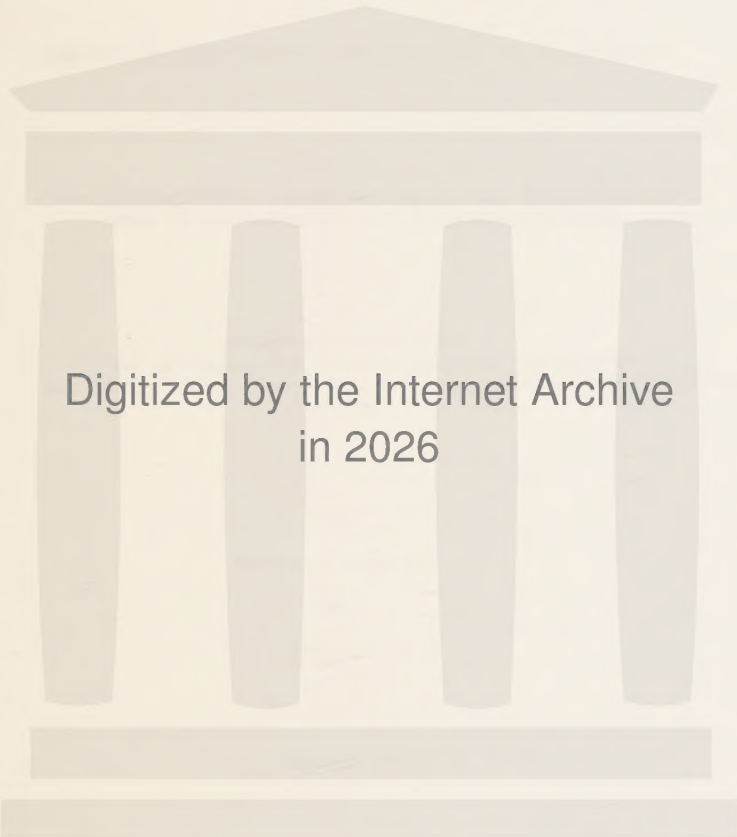


**Untersuchungen über die Monosaccharid- und
Aminosäurenaufnahme in die Leberzelle
bei Lämmern und Schafen**

Norbert Promberger

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555625_0063

Aus dem Institut für Physiologie, physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

Angefertigt unter Leitung von Priv. Doz. Dr. E. Scharrer

Untersuchungen über die Monosaccharid- und Aminosäureauf-
nahme in die Leberzelle bei Lämmern und Schafen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Norbert Promberger

aus

Pressath

München 1977

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Priv.-Doz. Dr. E. Scharrer
Korreferent: Prof. Dr. D. Hegner

Tag der Promotion: 25. Februar 1977



Inhaltsverzeichnis

Seite

<u>Einleitung</u>	1
<u>Literatur</u>	2 - 5
1. Die Aufnahme von Hexosen in die Leberzelle	2 - 3
2. Die Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle	4
3. Der Einfluß von Hormonen auf die Aminosäuren- aufnahme in die Leberzelle	5
4. Die Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle in Abhängigkeit vom Alter	5
<u>Methodischer Teil</u>	6 - 11
1. Tiermaterial	6
2. Fütterung	7 - 8
3. Versuchstechnik	8 - 11
a) Anfertigung von Leberschnitten	8
b) Inkubation der Leberschnitte	8 - 9
c) Ermittlung des Probengewichtes	9
d) Messung der Radioaktivität	10
e) Berechnung der Ergebnisse	10 - 11
<u>Tabellen</u>	12 - 16
<u>Ergebnisse</u>	17 - 38
Versuchsreihe I	
Aufnahme von Monosacchariden in die Leberzelle von Schafen, Lämmern und Ratten (m. Abbildungen)	17 - 23
Versuchsreihe II	
Aufnahme von Monosacchariden sowie von α -Ami- noisobuttersäure (AIB) in die Leberzelle von Lämmern, die entweder lactosereich oder lactose- arm gefüttert worden waren (m. Abbildungen)	23 - 30
Versuchsreihe III	
Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle von Schafen und Lämmern mit fütterungsbedingt unter- schiedlicher Vormagenentwicklung (m. Abbildungen)	31 - 38
<u>Diskussion</u>	39 - 41
<u>Zusammenfassung</u>	42 - 43
<u>Abstract</u>	44 - 45
<u>Literaturverzeichnis</u>	46 - 57

Einleitung

Der Kohlenhydratstoffwechsel des Wiederkäuers erfährt während der Vormagenentwicklung eine tiefgreifende Umstellung.

Beim Lamm entwickeln sich die Funktionen des Vormagensystems normalerweise im Altersabschnitt von drei bis acht Wochen. Während dieser Entwicklungsphase nimmt die Resorption von Monosacchariden aus dem Darm stark ab, da mit fortschreitender Vormagenentwicklung zunehmend mehr Kohlenhydrate durch die Mikroorganismen des Vormagensystems zu flüchtigen Fettsäuren abgebaut werden. Parallel dazu steigt die Gluconeogeneserate an, während die Glucoseutilisationsrate zurückgeht. Ferner sinkt der Blutzuckerspiegel während dieser Phase allmählich auf etwa 50 mg/100 ml ab. (58)

Aufgrund dieser entwicklungsbedingten Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels interessierte, wie sich beim Lamm die Monosaccharidaufnahme in die Leberzelle in Abhängigkeit von Alter und Vormagenentwicklung verhält.

Es wird daher in der vorliegenden Arbeit über entsprechende Versuche an Leberschnitten berichtet. Zum Vergleich wurden auch Untersuchungen über die Aminosäureaufnahme in die Leberzelle durchgeführt.

Literatur

Die Aufnahme von Hexosen in die Leberzelle

Während einer Hyperglykämie nimmt die Leberzelle vom Blut Glucose auf und gibt umgekehrt während einer Hypoglykämie Glucose ans Blut ab (11,15,31,55).

1958 zeigte Cahill in vivo an der Ratte, daß sich die Glucosekonzentration des intrazellulären Leberwassers sehr schnell der Glucosekonzentration des Plasmas angleicht (15). In anderen Studien wurde dies auch für weitere metabolisierbare wie auch nicht metabolisierbare Monosaccharide nachgewiesen (104). Cahill et al. schlossen daraus auf eine freie Diffusion der Hexosen durch die Zellmembran in beiden Richtungen (15). Der für Monosaccharide beobachtete rasche Konzentrationsausgleich zwischen Plasma und Leberwasser schließt allerdings eine erleichterte Diffusion nicht aus (59,60,103).

Als "erleichterte Diffusion" bezeichnet man die mit Hilfe eines Carriers erfolgende Diffusion eines Stoffes durch eine Membran (15,89). Williams et al. zeigten, daß die Penetration von Monosacchariden, inclusive D-Glucose, in die Leberzelle ein stereospezifischer Prozess mit den Eigenschaften der erleichterten Diffusion ist (104).

Ähnliche Verhältnisse gelten für den Muskel, den Erythrozyten und das Fettgewebe (104). Goresky et al. führten an der Rattenleber kinetische Untersuchungen über den Glucosetransport durch die Zellmembran durch (31,40). Charakteristisch für den Glucosetransport waren dabei: Sättigungskinetik, kompetitive Hemmung, Gegentransport und Stereospezifität.

Beim Gegentransport (= Austauschdiffusion) wird der Transport eines Monosaccharides durch die Zellmembran mit dem in entgegengesetzter Richtung erfolgenden Transport eines anderen Monosaccharides gekoppelt, das um das gleiche Transportsystem konkurriert. Daraus resultiert eine Beschleunigung des Transportes beider Substrate (89). Die erleichterte Diffusion von Glucose in die Leberzelle wird von Insulin nicht beeinflusst (31,45).

Zur Untersuchung des Zuckertransportes durch die Zellmembran dienten außer D-Glucose auch 3-O-Methylglucose (3-MG), α -Methylglukopyranosid (α -MG) und 2-Desoxyglucose (DG) (27,35,36,45,67,87). Bauer und Heldt (10) berichteten 1976 über die Aufnahme von D-Glucose und 3-MG sowie von DG in isolierte Leberzellen von Ratten.

Diese drei Monosaccharide konkurrieren nach diesen Untersuchungen um dasselbe Transportsystem der Zellmembran.

3-MG und DG sind damit als Modellzucker für Untersuchungen über die Glucoseaufnahme in die Leberzelle geeignet.

3-MG wird nicht metabolisiert. An Leberschnitten der Ratte fanden Sanders und Sagur (87) ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärer 3-MG Konzentration nach einer Inkubation von 30 Minuten.

Feldman et al. (35) ermittelten zwei Mechanismen für die Aufnahme von 3-MG in die Leberzelle: einen nicht sättigungsfähigen Prozess, der der einfachen Diffusion entspricht, und einen sättigungsfähigen Prozess, dessen kinetische Parameter charakteristisch für die erleichterte Diffusion sind.

Letzterer herrschte bei einer extrazellulären 3-MG-Konzentration von weniger als 5 mM vor. In der Leberzelle der Ratte wird unter Gleichgewichtsbedingungen nach Csaky und Glenn (27) annähernd die gleiche Konzentration von 3-MG erreicht wie im Plasmawasser. Hetenyi und Studney fanden dagegen 1966 (45), daß 3-MG sich nur in 85 % des gesamten Leberwassers verteilt.

2-Desoxy-D-Glucose (DG) wird in der Zelle nur in 2-Desoxy-D-Glucose-1-Phosphat umgewandelt. Eine weitere Metabolisierung findet nicht statt. DG wird über dasselbe Transportsystem in die Zelle geschleust wie 3-MG und Glucose. In der Leberzelle fanden Fishman und Reiner bei in *vitro* Versuchen an Rattenleberschnitten unter gleichen Bedingungen für DG und 3-MG annähernd gleiche Konzentrationen (36).

α -Methylglukosid (α -MG) wird in der Zelle wie 3-MG nicht metabolisiert (41,51). Bei Untersuchungen an Leberschnitten der Ratte über die intrazelluläre α -MG-Aufnahme stellte sich nach 30 Minuten ein Gleichgewicht ein:

Dabei war die α -MG Konzentration im intrazellulären Wasser mit derjenigen im Inkubationsmedium annähernd identisch (15).

Phlorizin, das an Darm und Niere den Zuckertransport hemmt, hat offensichtlich nach Untersuchungen an Leberschnitten auf den Transport von α -MG in die Leberzelle keinen Einfluß (23).

Dinitrophenol und Na^+ - freies Medium beeinflussten an Leberschnitten der Ratte den Transport von α -MG nicht. Crawhall und Segal vermuteten daher, daß α -MG in die Leberzelle ohne carrier-vermittelten Transport eindringt (23).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß nach den bislang vorliegenden Untersuchungen Glucose und andere Monosaccharide offenbar rasch in die Leberzelle aufgenommen werden. Dabei gleicht sich nach den Angaben der meisten Autoren die intrazelluläre der extrazellulären Monosaccharidkonzentration an.

Die Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle

Untersuchungen über den Transport von Aminosäuren durch die Zellmembran der Leberzelle wurden meist mit nichtmetabolisierbaren Aminosäuren durchgeführt, da die hohe Metabolisierungsrate der Leber für natürliche Aminosäuren Transportuntersuchungen erschwert (8,17,18,22,23,32,37,48,53,58,74,75,85,93,94,101). Als Modellaminosäuren für derartige Versuche dienten daher häufig die nicht metabolisierbaren Aminosäuren α -Aminoisobuttersäure (AIB) und Cycloleucin.

Aminosäuren werden unter Verbrauch von Energie gegen ein Konzentrationsgefälle in die Zelle transportiert (23,42,43,49,53,74). Der aktive Transport von Aminosäuren in die Leberzelle wird daher bei Mangel an Sauerstoff gehemmt (93). Ebenso wird er durch 2,4 Dinitrophenol inhibiert, das die oxidative Phosphorylierung blockiert (93). Abwesenheit von Mg^{++} hat keinen deutlichen Einfluß auf den AIB Transport (93). Einen weiteren Hemmeffekt auf die Aufnahme von AIB in die Leberzelle verursacht Jodessigsäure durch Reaktion mit SH-Gruppen (24). Auch Quabain, ein Inhibitor der Na^+K^+ -ATPase, hemmt die Aminosäureaufnahme in die Leberzelle (8, 24,34,93). Die Abhängigkeit des aktiven Aminosäuretransportes von der Anwesenheit und Verteilung von Na^+ wurde schon 1952 festgestellt (24).

In Na^+ -freiem Medium wird die Aminosäureaufnahme stark reduziert (20,24). Besonders das Transportsystem A, dem gegenüber Alanin, Glycin, Prolin sowie AIB eine hohe Affinität aufweisen, ist in hohem Maße auf Na^+ angewiesen (20,99).

Das Transportsystem L, das Na^+ -unabhängig ist, transportiert vor allem Aminosäuren mit umfangreichem Kohlenstoffgerüst (21,77). AIB konkurriert also mit den oben angeführten Aminosäuren um das Transportsystem A, während Cycloleucin vor allem über das System L in die Zelle transportiert wird. Aminosäuren, die zum gleichen Transportsystem der Zellmembran eine Affinität haben, hemmen sich beim Transport kompetitiv (24,43).

Für Aminosäuren, die vom selben Transportsystem transportiert werden, kann das Phänomen der Austauschdiffusion demonstriert werden.

Hat eine Zelle eine bestimmte Aminosäure aufgenommen, so beschleunigt der Efflux dieser Aminosäure die weitere Aufnahme derselben Aminosäure ("autoexchange") oder die Aufnahme einer anderen Aminosäure, sofern diese eine Affinität zum selben Transportsystem hat ("heteroexchange") (24).

Der Einfluß von Hormonen auf die Aminosäurenaufnahme in die Leberzelle

An Leberschnitten von Ratten konnten Crawhall und Purkiss (25) im Gegensatz zu in vivo Versuchen (8) und Versuchen an der perfundierten Rattenleber (16) keine Stimulierung des AIB-Transportes durch Insulin nachweisen. Auch Blatt (13) fand an Leberschnitten von Ratte und Schaf keinen Effekt von Insulin auf die AIB-Aufnahme in die Zelle.

An Leberschnitten von Ratten erhöhte dagegen Glukagon den AIB-Transport in die Zelle (95). Dieser Effekt kommt wahrscheinlich über eine Aktivierung des Adenylzyklasesystems zustande, da ähnliche Ergebnisse mit cyclischem 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP) erzielt wurden (95,96). Demgegenüber konnte Blatt an Leberschnitten von Schafen keinen stimulierenden Effekt von Glukagon auf die AIB-Aufnahme in die Zelle nachweisen. Glukagon hemmte in diesen Versuchen die intrazelluläre AIB-Aufnahme sogar geringfügig (13).

Auch Adrenalin zeigte bei der Ratte einen fördernden Einfluß auf die AIB-Aufnahme (95).

Futterentzug führt bei Ratten zu einer erhöhten Aminosäureaufnahme in die Leberzelle (74). Nach Untersuchungen mehrerer Autoren (6,7,96,98) bedingt auch proteinreiche Ernährung eine beschleunigte AIB-Aufnahme in die Leberzelle. Auch dieser Effekt scheint durch eine Erhöhung der cAMP-Konzentration in der Zelle zustandezukommen (14,95,96).

Die Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle in Abhängigkeit vom Alter

Beim Meerschweinchen wurde kurz nach der Geburt ein deutlicher Anstieg der AIB-Aufnahme in die Leberzelle festgestellt (18). Bei der Ratte fanden Tews und Harper (94) im Zeitraum von 1-80 Tagen post partum an Leberschnitten einen kontinuierlichen Abfall der AIB-Aufnahme in die Leberzelle.

Ähnliche Befunde wurden auch in vivo erhoben (17,75,85). Auch an der Muskelzelle der Ratte wurde eine altersabhängige Abnahme der AIB-Aufnahme verzeichnet (32,37). Beim Schaf wurde ebenfalls an Leber- und Muskelzelle eine mit fortschreitendem Alter zurückgehende AIB-Aufnahme gefunden (13,48).

Methodischer Teil

1. Tiermaterial

Alle für diese Arbeit verwendeten Schafe gehörten zur Rasse "Merino-Landschaf", die Ratten zur Rasse "Sprague Dawley".

- a) Für die Versuche der Reihe I über die Monosaccharidaufnahme in die Leberzelle in Abhängigkeit vom Alter wurden Lämmer im Alter von 2-4 Tagen (Gewicht 3,1 bis 4,5 kg) sowie Schafe im Alter von 1,8 bis 5 Monaten (Gewicht 12,5 bis 40 kg) herangezogen.
- b) Für die Versuche der Reihe II über die Zucker- und Aminosäureaufnahme in die Leberzelle unter verschiedenen Fütterungsbedingungen dienten Schafe im Alter von 4-6 Wochen mit einem Gewicht von 3,7 bis 8,3 kg.
(Das niedrige Gewicht der Tiere erklärt sich aus der Verfütterung von Diäten extremer Zusammensetzung. Siehe Seite 7 2.c.)
- c) Für die Versuche der Reihe III über die Aminosäureaufnahme und die Aufnahme von 3-O-Methylglucose in Abhängigkeit von Alter und Vormagenentwicklung standen Schafe im Alter von ca. 4 Monaten (Gewicht 17,0 bis 28,0 kg) sowie Lämmer im Alter von 2-7 Tagen (Gewicht 3,6 bis 4,4 kg) zur Verfügung.
- d) Zum Vergleich wurden auch Untersuchungen an Ratten im Alter von 2 Wochen (Gewicht 25 g) bis zum Alter von über 3 Monaten (Gewicht 424g) durchgeführt.

2. Fütterung

- a) Alle Lämmer im Alter von bis zu 7 Tagen wurden ausschließlich mit Muttermilch ernährt.
- b) Die älteren Tiere der Versuchsreihe I wurden nach dem Absetzen vom Mutterschaf an einem Fütterungsautomaten ⁺⁾¹ mit einem Milchaustauscher für Lämmer "Biofix L" ⁺⁾² (siehe Tab.1) ad libitum gefüttert. Gleichzeitig erhielten sie Heu und Kraftfutter zur freien Aufnahme. Ab der 4. bis 5. Lebenswoche wurde ausschließlich Maissilage, Heu und Kraftfutter zur freien Aufnahme angeboten.
- c) Für die Versuchsreihe II wurden die Lämmer im Alter von 3-12 Tagen vom Mutterschaf abgesetzt. Anschließend bekamen sie über den Fütterungsautomaten Milchaustauschertränke ad libitum. Nach 7 Tagen wurden die Lämmer in zwei nach Gewicht und Geschlecht möglichst gleiche Gruppen eingeteilt und entweder mit einer lactosereichen (= Gruppe A; Zusammensetzung der Tränke siehe Tab.3) oder lactosearmen Diät (= Gruppe B; Zusammensetzung der Tränke siehe Tab.4) ad libitum gefüttert. Wegen der schlechten Löslichkeit wurde die Konzentration der Tränke bei Gruppe B nach 7 Tagen von 172,5 g / 1 Wasser auf 130 g / 1 Wasser vermindert. Nach weiteren 5 Tagen wurde die lactosearme Diät wegen Unverträglichkeitserscheinungen (Durchfall, Gewichtsverlust) im Verhältnis 1:1 mit Biofix L vermengt. Die Konzentration von 130 g / 1 Wasser wurde beibehalten. Wasser wurde zur freien Aufnahme angeboten.
- d) Für die Versuchsreihe III wurden die Lämmer nach dem Absetzen vom Mutterschaf in den ersten 4 Wochen am Fütterungsautomaten mit Milchaustauschertränke Biofix L (siehe Tab. 1) ad libitum ernährt. Anschließend wurden die Tiere in zwei nach Gewicht und Geschlecht möglichst gleiche Gruppen aufgeteilt. Während bei der einen Gruppe die Entwicklung des Vormagensystems durch ausschließliche Ernährung mit Milchaustauschertränke gehemmt wurde (M - Lämmer), wurde der anderen Gruppe, um eine physiologische Entwicklung des Vormagensystems zu erreichen, wiederkäuergerecht Heu und Kraftfutter (siehe Tab. 2) ad libitum angeboten. Durch allmähliche Reduzierung der Milchaustauschertränke wurde diese Gruppe im Alter von ca. 6 Wochen ausschließlich auf Heu und Kraftfutter umgestellt (HK - Lämmer).

⁺⁾¹ Fa. Förster, Landwirtsch. Apparatebau, Tettnang/Allgäu
⁺⁾² Bayerische Milchindustrie, München-Landshut

Beiden Gruppen wurde eine Mineralsalzmischung (siehe Tab. 2) sowie Wasser zur freien Aufnahme angeboten.

- e) Die zur Verfügung stehenden Ratten erhielten Wasser und Altromin ⁺⁾¹ zur freien Aufnahme.

Alle Tiere konnten bis kurz vor ihrer Tötung beliebig Wasser und Futter aufnehmen.

3. Versuchstechnik

- a) Anfertigung von Leberschnitten

Die Ratten wurden mit Äther betäubt. [®] ⁺⁾² (1mg/kg Körpergewicht i.m.) und Ketanest [®] ⁺⁾³ (2,5 mg/kg Körpergewicht i.m.). Die Tiere der Versuchsreihe III wurden mit Rompun [®] in oben genannter Dosis und Narkoren [®] ⁺⁾⁴ (1 ml/20 kg Körpergewicht iv.) narkotisiert. Dem betäubten Tier wurde ein Stück Leber entnommen, das sofort in eiskalten Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Puffer (KHB-Puffer) (siehe Tab. 7) gelegt wurde.

Mit einem "Stadie-Riggs" Mikrotom wurden Leberschnitte angefertigt. Der erste Schnitt wurde jeweils verworfen. Die Schnitte waren ca. 0,3 bis 0,5 mm dick. Das Gewicht der Schnitte lag bei etwa 30 - 40 mg.

- b) Inkubation der Leberschnitte

Etwa 100 mg Lebergewebe (= 3 Schnitte) wurden in einem Erlenmeyerkolben überführt, der 3 ml KHB-Puffer enthielt. Dann wurde mit Carbogen ($O_2:CO_2 = 95:5$ [v:v]) begast und 15 Minuten vorinkubiert.

⁺⁾¹ Ratten und Mäuse Standard Diät, Altromin GmbH, Lage/Lippe
⁺⁾² 2 %ige Lösung, Bayer Leverkusen
⁺⁾³ 50 mg/ml, Parke Davis & Co., München
⁺⁾⁴ Merieux-Rentschler GmbH, Laupheim

- ba) In den Versuchen der Versuchsreihe I und II, in denen der Zeitverlauf der Substrataufnahme untersucht wurde, wurden die Leberschnitte nach der Vorinkubation in substrathaltiges Medium überführt. Die Schnitte wurden nach 7,5; 15; 30; 60 und 120 Minuten aus dem Medium entnommen. Als Substrate dienten Glucose, 3-O-Methylglucose, 2-Desoxyglucose und α -Methylglucosid. Konzentrationen der Substrate sind in Tab.6 zusammengestellt. Alle Substrate waren ^{14}C markiert.
- bb) In den Versuchen der Reihe III folgte der Vorinkubation eine Inkubation über 90 Minuten in Gegenwart verschiedener Hormone. Dabei wurden die Schnitte jeweils nach 30 Minuten in einen Kolben mit frischem Medium überführt. Anschließend wurden die Schnitte in einem Kolben, der α -Aminoisobuttersäure- bzw. 3-O-Methylglucosehaltigen (Konzentrationen siehe Tab. 6) KHB-Puffer enthielt, 60 Minuten lang inkubiert.

Während der Hauptinkubation war im Medium, außer bei Kontrollen, Glukagon, Adrenalin oder cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat anwesend. (Konzentration siehe Tab. 6).

- bc) Die gesamte Inkubation und Vorinkubation erfolgte im Wasserbad bei 37° C, einer Schüttelfrequenz von 120 Ausschlägen pro Minute sowie in Carbogenatmosphäre ($\text{O}_2: \text{CO}_2 = 95 : 5$ [v:v]). Als Medium diente in allen Fällen KHB-Puffer.
Nach Beendigung der Inkubation wurden die Schnitte kurz in physiologischer Kochsalzlösung geschwenkt, um die oberflächlich haftende Radioaktivität abzuspielen und anschließend auf Filterpapier abgetupft.

- c) Ermittlung des Probengewichtes

Ein Teil der Schnitte wurde nach der Inkubation auf "Verbrennungshütchen" überführt. Die Proben wurden anschließend 24 Stunden bei 105° C getrocknet. Hierauf wurde das Trockengewicht ermittelt. Das Trockengewicht betrug im Mittel 20,1 % des Naßgewichtes.
Der andere Teil der Schnitte wurde in Scintillationsfläschchen überführt und gewogen.

d) Messung der Radioaktivität

da) Ein Teil der Proben der Versuchsreihen I und III, sowie alle Proben der Versuchsreihe II wurden zur Aktivitätsbestimmung mit 1 ml Soluene 350 (Tissue Solubilizer, Packard Instruments) über 24 Stunden bei 40° C aufgelöst. Danach wurden 20 ml Toluol-Scintillationslösung (5,5 g Permafluor V (Packard Instruments) in 1 Liter Toluol) zugefügt. Zur Berechnung der Zählausbeute wurde mittels eines Standards eine Quenchkurve erstellt, mit deren Hilfe die absolute Aktivität berechnet werden konnte. Zur Bestimmung der ^{14}C -Aktivität des Inkubationsmediums diente als Scintillationslösung Unisolve (Koch-Light Laboratories Ltd., Colnbrook Bucks England). Dabei wurde zu 10 ml Unisolve 0,2 ml Inkubationsmedium pipettiert. Die Zählausbeute wurde in diesem Fall mit einem internen Standard ermittelt.

db) Bei einem Teil der Untersuchungen enthielt das Inkubationsmedium neben dem ^{14}C - markierten Substrat zur Beurteilung des Extrazellulärraumes der Schnitte ^3H -markiertes Inulin. Die entsprechenden Gewebeproben sowie aliquote Teile des Inkubationsmediums wurden in diesem Fall in einem Verbrennungsautomaten (Packard Sample Oxidizer, Modell 306) verbrannt. Dieser Apparat trennt nach der Verbrennung die Proben in ^{14}C bzw. ^3H haltige Fraktionen, die in Zählfläschchen abgefüllt werden. Für die ^3H - Messung diente als Scintillationslösung "Monophase 40", für die ^{14}C -Messung als CO_2 -Absorber "Carbo-Sorb", als Scintillationsflüssigkeit "Permafluor V" (alle Reagenzien von Packard Instruments).

dc) Die Radioaktivität wurde mittels zweier Flüssigkeits-scintillationszähler (Packard Tricarb Scintillation Spectrometer, Modell 3375 und 3385) ermittelt.

e) Berechnung der Ergebnisse

Die Aufnahme der Substrate in die Leberzelle wurde anhand des Quotienten zwischen der intra- und extrazellulären Substanzkonzentration ($= \frac{[S]_i}{[S]_a}$) beurteilt.

Der intrazelluläre Flüssigkeitsanteil berechnet sich aus dem Gesamtwassergehalt des Gewebes minus dem extrazellulären Flüssigkeitsanteil (= Inulinraum). Inulin verteilt sich in relativ kurzer Zeit gleichmäßig nur im extrazellulären Wasser (43,62,75,99).

Zur Bestimmung des extrazellulären Raumes wurde daher, wie bereits erwähnt, dem Inkubationsmedium neben dem ^{14}C -markierten Substrat ^3H -markiertes Inulin (Konzentration siehe Tab. 6) zugefügt. Die Gewebeprobe wurden im oben erwähnten Oxidizer verbrannt. So war es möglich, für dieselbe Gewebeprobe die intrazelluläre Aufnahme des ^{14}C -markierten Substrates sowie anhand der ^3H -Aktivität den Inulinraum zu bestimmen. Der für Leberschnitte ermittelte Inulinraum lag in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Blatt (13) im Mittel bei 29% des Naßgewichtes.

Der Inulinraum wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Inulinraum (ml/g Gewebe)} = \frac{{}^3\text{H Aktivität (dpm)/g Gewebe}^{+)}1}{{}^3\text{H Aktivität (dpm)/ml Medium}}$$

Der Verteilungsquotient zwischen der intra- und extrazellulären Konzentration des jeweiligen Substrates ($[S]_i/[S]_a$) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[S]_i/[S]_a = \frac{{}^{14}\text{C-Aktivität(dpm)/g Gewebe-ml Inulinraum/}}{\text{/g Gewebe} \times \frac{{}^{14}\text{C-Aktivität (dpm)/ml Medium}}{(\text{ml Wasser/g Gewebe} - \text{ml Inulinraum/g Gewebe}) \times {}^{14}\text{C-Aktivität(dpm)/ ml Medium}}}$$

Es wurde jeweils der Mittelwert $\bar{x}$ von 6 Schnitten für ein Einzelergebnis herangezogen.

$\bar{x}$ und die jeweils angegebene Standardabweichung s wurden wir folgt errechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

⁺⁾¹ dpm = Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute)

Tabelle 1

Zusammensetzung von Biofix L
(Milchaustauscher für Lämmer)

Tränkekonzentration 160 g/ l

Magermilchpulver	57,5
Fett	30,0
Süßmolkenpulver	2,5
teilverzuckerte Maisquellstärke	8,0
wasserfreie Kieselsäure (Fließhilfstoß)	1,0
Mineralstoffvornischung	0,7
Antibiotikavornischung	0,2
Vitaminvornischung	0,1
	<u>100,0</u>

Tabelle 2

Zusammensetzung des Kraftfutters

Sojaschrot	33,3
Zuckerrübenschnitzel	30,8
Haferchrot	16,7
grob gemahlenes Gerstenschrot	16,7
Mineralsalz-Vitamin-Vornischung für Lämmer +)1	2,5
	<u>100,0</u>

+)1 Karlshulder Mineralfutter für Lämmer
Hersteller: Chemische Fabrik Aubing

Tabelle 3

Zusammensetzung der lactosereichen
Diät (= Diät A)

Tränkekonzentration: 213 g/ 1

Kasein	+)1	25,00
Mineralstoffe	+)2	4,00
Vitamine	+)3	1,00
Sojaöl		2,00
Lactose		67,97
Antibiotika		0,03
		<u>100,00</u>

Tabelle 4

Zusammensetzung der lactosearmen
Diät (= Diät B)

Tränkekonzentration: 172,5 g/ 1

Fett		17,00
Kasein	+)1	72,72
Weizenquellmehl		5,00
Siliziumoxid		1,00
Mineralstoffe	+)2	3,00
Vitamine	+)3	0,70
Emulgator		0,55
Antibiotika		0,03
		<u>100,00</u>

-
- +)1 mit 1 % Methionin ergänzt
+)2 siehe Tabelle 5 a
+)3 siehe Tabelle 5 b

Tabelle 5 a

Zusammensetzung der Vitamin-
Vormischung

Vitamin A	I.E.	533350
Vitamin D ₃	I.E.	66650
Vitamin E	mg	1650
Vitamin K ₃	mg	43,5
Thiamin (B ₁)	mg	165
Riboflavin (B ₂)	mg	200
Pyridoxin (B ₆)	mg	100
Vitamin B ₁₂	mcg	1000
Biotin	mg	3,5
Folsäure	mg	6,5
Ca-Pantothenat	mg	650
Nikotinsäure	mg	1650
Askorbinsäure	mg	2650
Cholinchlorid	mg	9400
Soja Feinmehl	ad	100 g

Tabelle 5 b

Zusammensetzung der Mineral-
stoff-Vormischung

CaCO ₃	25,00
Ca ₃ (PO ₄) ₂	23,40
K ₂ HPO ₄	16,70
NaCl	13,30
Na ₂ HPO ₄	11,60
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	8,32
Fe-Zitrat	0,74
MnSO ₄ x H ₂ O	0,76
ZnCO ₃	0,066
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,032
KJ	0,066
NaF	0,016
	<u>100,000</u>

Tabelle 6

Konzentrationen der den Inkubationsmedien
zugefügten Substrate bzw. Hormone

3-O-Methyl-D-Glucose (1 - ^{14}C markiert) +)1 +)2	5	mM
Methyl - α - D - Glucopyranosid (uniform mit ^{14}C markiert +)3 +)4	5	mM
2-Deoxy-D-Glucose (1 - ^{14}C markiert) +)1 +)4	5	mM
α - Aminoisobuttersäure (1 - ^{14}C markiert) +)3 +)5	1	mM
Inulin (uniform mit ^3H markiert) +)3 +)6	0,05	mM
Glukagon +)5	2,9	μM
Adrenalin +)5	0,01	mM
Adenosin 3', 5' monophosphor- säure +)6	1	mM
D (+) Glucose (uniform mit ^{14}C markiert)+)3 +)7	5	mM
Spermidin +)5	5	mM

-
- +)1 New England Nuclear Corp. Boston Mass. USA
 - +)2 Sigma Chemical Company St. Louis USA
 - +)3 Radiochemical Center Amersham
Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
 - +)4 Fluka AG, Buchs SG, Schweiz
 - +)5 Serva Feinbiochemika, Heidelberg
 - +)6 Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
 - +)7 E. Merck AG, Darmstadt

Die erste Fußnote hinter der jeweiligen Benennung zeigt
die Bezugsquelle des radioaktiv markierten, die zweite
die des unmarkierten Stoffes an.

Tabelle 7

Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer-Lösung ⁺⁾¹

NaCl-Lösung	0,90 %	100 Teile
KCl -Lösung	1,15 %	4 Teile
CaCl ₂ -Lösung	0,11 mM	3 Teile
KH ₂ PO ₄ -Lösung	2,11 %	1 Teil
MgSO ₄ x H ₂ O-Lösung	3,82 %	1 Teil
NaHCO ₃ -Lösung ⁺⁾²	1,30 %	21 Teile

⁺⁾¹ Der Puffer wurde vor Gebrauch mit Carbogen
(O₂:CO₂ = 95:5 [v:v]) begast und auf pH 7,4 eingestellt.

⁺⁾² Die NaHCO₃-Lösung wurde vor Gebrauch 1 Stunde lang mit
CO₂ begast.

Ergebnisse

Versuchsreihe I

Aufnahme von Monosacchariden in die Leberzelle von Schafen, Lämmern und Ratten

- a) Aufnahme von 3-O-Methylglucose (3-MG) in die Leberzelle von Schafen, Lämmern und Ratten

Vorversuche an Ratten (Abb.1a) zeigten, daß 3-MG in die Leberzelle eintritt. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten hatte die 3-MG Konzentration der intrazellulären Flüssigkeit diejenige des Inkubationsmediums in etwa erreicht, d.h. für die Größe $\frac{[3-MG]_i}{[3-MG]_a}$ wurde ein Wert von annähernd eins erhalten.

Dagegen war bei Lämmern (bis 7 Tage alt) und Schafen (ca. 4 Monate alt) so gut wie kein Eintritt von 3-MG in die Leberzelle festzustellen (Abb.1b). Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten wurden für $\frac{[3-MG]_i}{[3-MG]_a}$ Werte um 0,1 erhalten.

Auch bei 3-4 Monate alten Lämmern mit fütterungsbedingten Unterschieden in der Vormagenentwicklung (Gruppe M = ausschließliche Fütterung mit Milchaustauschtränke; Gruppe HK = Fütterung mit Heu und Kraftfutter) ergaben sich entsprechende Werte (Abb.1c). Ein Gruppenunterschied war nicht zu verzeichnen.

- b) Aufnahme von α -Methylglucosid (α -MG) in die Leberzelle von Schafen und Lämmern

Es wurde die α -MG-Aufnahme in die Leberzelle von 3-7 Tage alten Lämmern und von 1,8 - 5 Monate alten Schafen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht (Abb.2a und 2b). Eine Abhängigkeit der Aufnahme vom Alter der Tiere scheint nicht vorzuliegen. Bei Lämmern wie auch bei Schafen kam es nach einer Inkubation von 120 Minuten nicht zu einem Ausgleich zwischen der intra- und der extrazellulären α -MG Konzentration.

Abb.1a Aufnahme von 3-O-Methylglucose (3-MG) in die Leber-
zelle der Ratten.

 3-MG-Konz: 5 mM
 3-MG-Konz: 1 mM
 n = Anzahl der Tiere

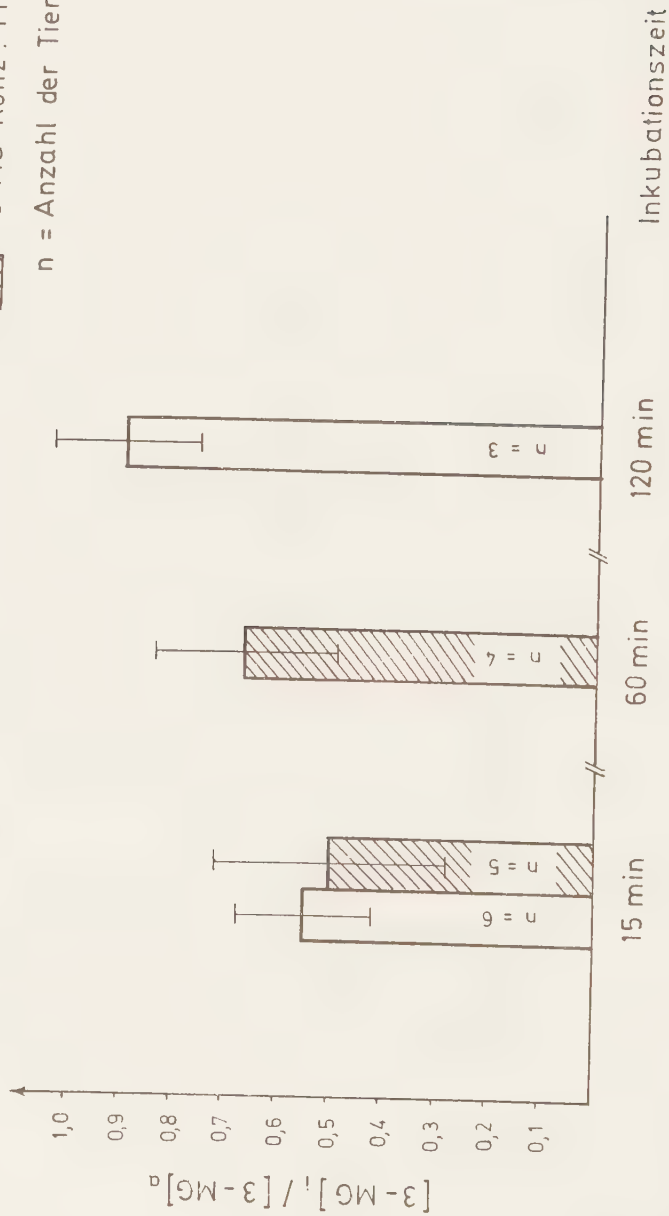


Abb.1b

Aufnahme von 3-O-Methylglucose (3-MG)
in die Leberzelle von Schafen (4 Monate alt)
und Lämmern (bis 7 Tage alt).

3-MG Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere

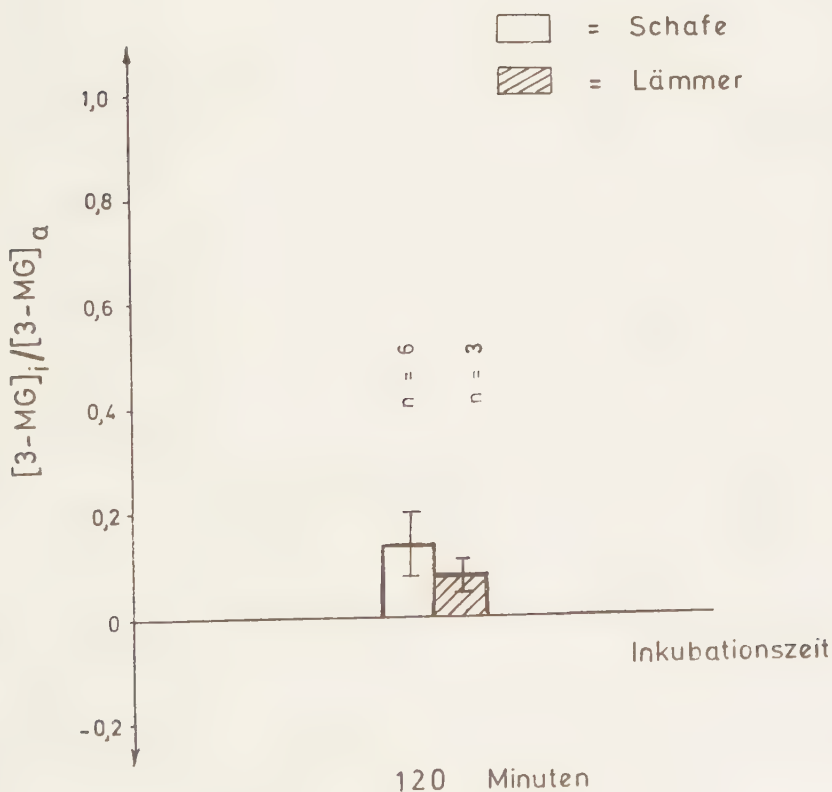


Abb. 1c Aufnahme von 3-O-Methylglucose (3-MG) in die Leberzelle von Junglämmern (bis 7 Tage alt), sowie von mit Milch (M) bzw. zusätzlich mit Heu und Kraffutter (HK) gefütterten Lämmern (ca. 4 Monate alt).

3-MG-Konz. des Mediums : 5 mM

Inkubationszeit : 120 min ;

n = Anzahl der Tiere

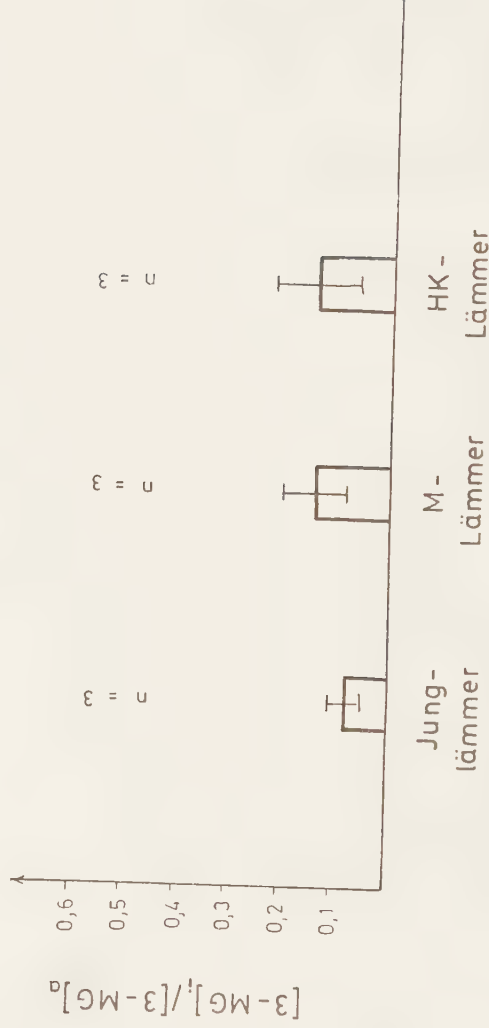


Abb. 2a

Aufnahme von α -Methylglucosid (α -MG) in die Leberzelle von Lämmern (2-7 Tage alt, 2,5 - 7,5 kg schwer)

α -MG-Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere

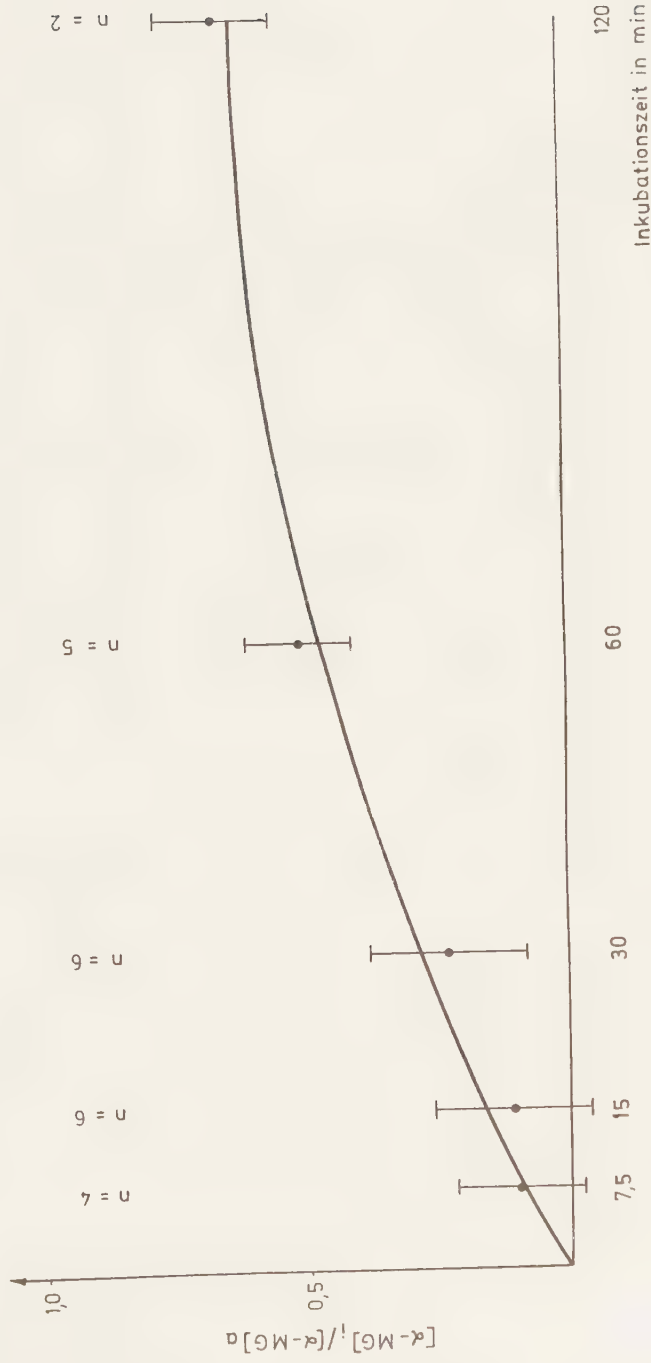


Abb.2b Aufnahme von α -Methylglucosid (MG) in die Leberzelle von Schafen (Alter 1,8 - 5 Monate, Gewicht 12,5 - 40 kg).

α -MG-Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere



Die intrazelluläre Konzentration war deutlich geringer als die extrazelluläre. Die Aufnahme scheint sowohl bei Lämmern wie bei Schafen relativ langsam zu erfolgen, denn erst nach einer Inkubationszeit von etwa 60 Minuten wurde für die Größe $\frac{[\alpha\text{-MG}]_i}{[\alpha\text{-MG}]_a}$ ein konstanter Wert von etwa 0,5 ermittelt.

- c) Aufnahme von 2-Desoxyglucose (DG) in die Leberzelle von Schafen und Lämmern

Der Verlauf der Aufnahme von DG in die Leberzelle von Schafen (6-16 Wochen alt) und von Lämmern (2,5-10 Tage alt) wurde untersucht. Ein Unterschied in der Aufnahme von DG in Abhängigkeit vom Alter läßt sich nicht feststellen (Abb. 3a und 3b).

Es kam weder bei Lämmern noch bei Schafen zu einem Ausgleich zwischen der intra- und der extrazellulären DG-Konzentration. Nach ca. 30 Minuten scheint die intrazelluläre Endkonzentration erreicht zu sein. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß DG in der Leber z.T. phosphoryliert wird. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten war nach papierchromatographischen Untersuchungen allerdings 84 % der ^{14}C -Aktivität der Leberschnitte an DG gebunden.

Versuchsreihe II

Aufnahme von Monosacchariden sowie von α -Aminoisobuttersäure (AIB) in die Leberzelle von Schafen, die entweder lactosereich (Gruppe A) oder lactosearm (Gruppe B) gefüttert worden waren

- a) Aufnahme von Glucose (Gl)

Aus Abb. 4 ist zu ersehen, daß die Gl-Aufnahme in die Leberzelle beim Schaf rascher erfolgt. Ein Ausgleich zwischen der intra- und extrazellulären Gl-Konzentration fand nicht statt.

Abb.3a Aufnahme von 2-Desoxyglucose (DG) in die Leberzelle von Schafen (Gewicht 18,0 - 40,0 kg, Alter 6-16 Wochen).

DG - Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere

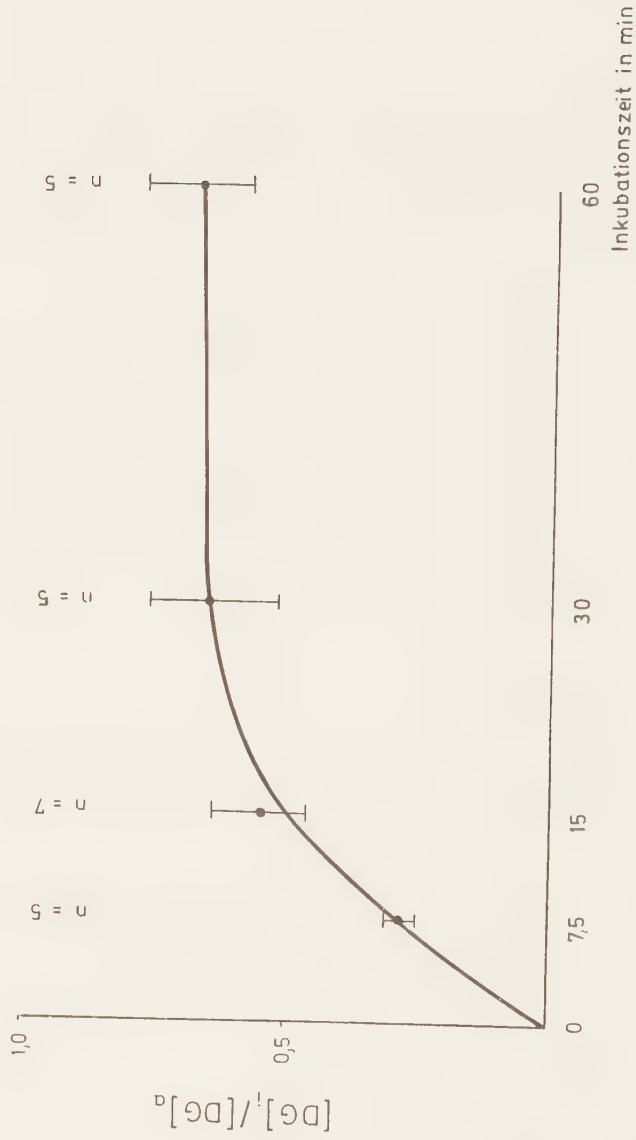


Abb.3b Aufnahme von 2-Desoxyglucose (DG) in die Leberzelle
von Lämmern (Gewicht 2,5 - 5,0 kg ; Alter 2,5 - 10 Tage).

DG-Konzentration des Mediums : 5 mM n = Anzahl der Tiere

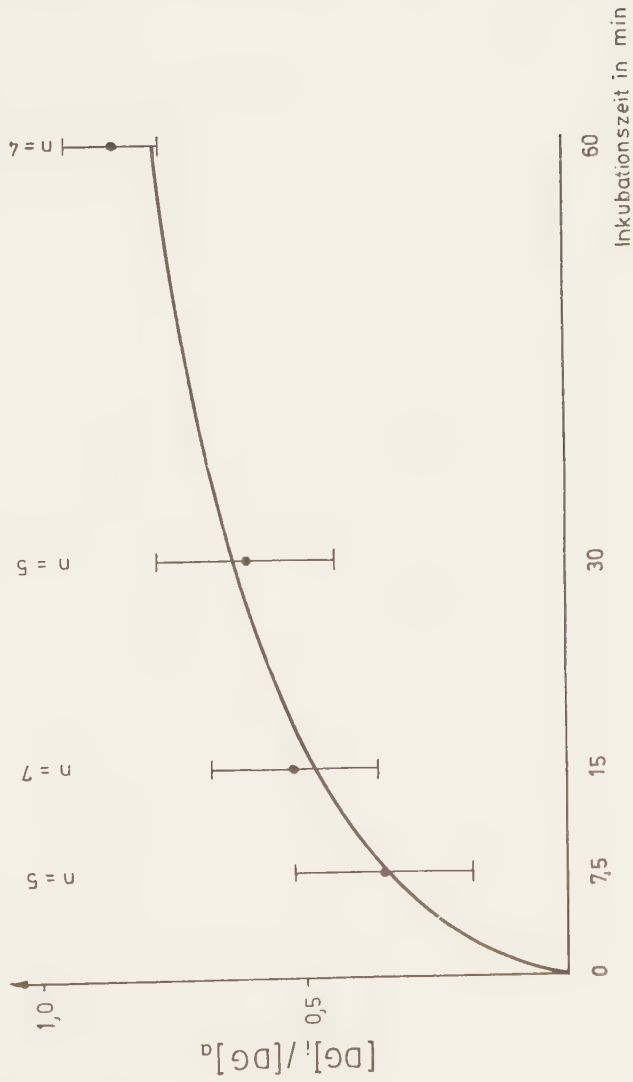


Abb.4 Aufnahme von Glucose (Gl) in die Leberzelle von Schafen, die entweder laktosereich (Gruppe A, siehe Tab.3) oder laktosearm (Gruppe B, siehe Tab. 4) gefüttert worden waren.

$\bar{x} \pm s$: siehe Tab.8

Gl - Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere



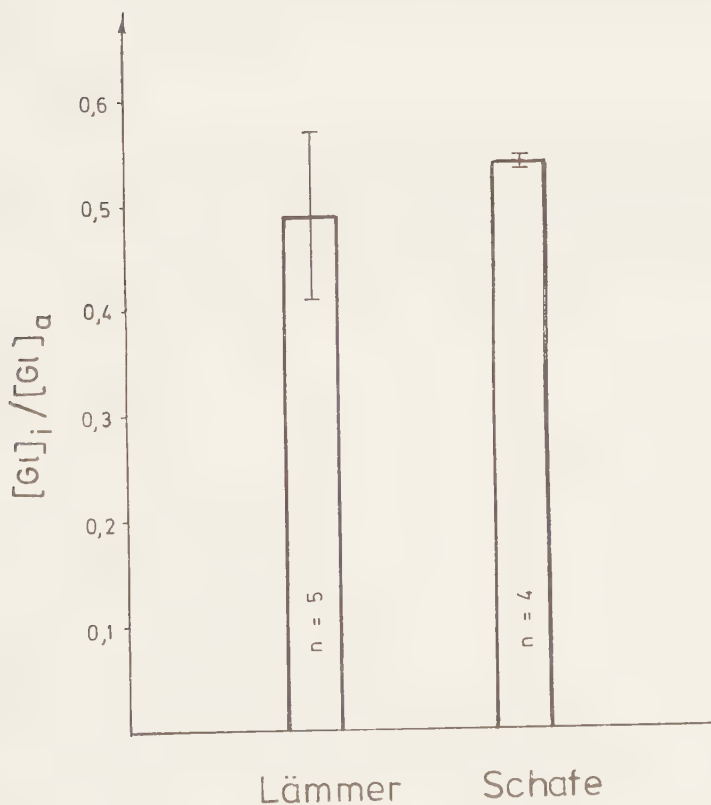
Abb.5

Aufnahme von Glucose (Gl) in die
Leberzelle von Lämmern (2-4 Tage alt)
und Schafen (6-8 Wochen alt).

Inkubationszeit: 15 Minuten

Gl - Konzentration des Mediums : 5 mM

n = Anzahl der Tiere



Ein deutlicher Unterschied in der Gl-Aufnahme war zwischen Gruppe A und B nicht zu registrieren. In Abb. 5 sind zum Vergleich die nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten gemessenen Werte für $[Gl]_i / [Gl]_a$ bei jungen Lämmern (Alter 2-4 Tage) und Schafen (Alter 6-8 Wochen) aufgeführt. Diese Werte sind mit denen der Abb. 4 in etwa identisch. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß Gl von den Leberschnitten nur in geringem Umfang metabolisiert wurde. Papierchromatographische Untersuchungen erbrachten, daß nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten ca. 92 % der in den Leberschnitten vorhandenen ^{14}C -Aktivität an Gl gebunden war. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten lag dieser Wert bei 82 %.

b) Aufnahme von α -Methylglucosid (α -MG)

Ergebnisse analoger Versuche mit α -MG sind in Abb. 6 dargestellt. Im zeitlichen Verlauf der Aufnahme von α -MG waren zwischen Gruppe A und B ebenfalls keine deutlichen Unterschiede zu erkennen. Die intrazelluläre Endkonzentration scheint nach ca. 40 Minuten erreicht zu sein. Deutlich ist auch hier der Unterschied zwischen intra- und extrazellulärer α -MG Konzentration im Gleichgewichtszustand.

Tabelle 8

Daten zu Abb. 4 und 6

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung

Inkubationszeit, min. 7,5 15 60 90

	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s	$\bar{x}$	s
<u>Gl</u>								
Gruppe A (n=4)	0,52	0,24	0,53	0,22	0,63	0,14	0,68	0,12
Gruppe B (n=7)	0,40	0,16	0,42	0,18	0,62	0,26	0,72	0,20
<u>α-MG</u>								
Gruppe A	0,18	0,09	0,19	0,07	0,31	0,03	0,33	0,05
Gruppe B	0,21	0,10	0,20	0,09	0,33	0,14	0,37	0,09

c) Aufnahme von Aminoisobuttersäure (AIB)

Abb.7 zeigt, daß kein deutlicher Unterschied in der AIB Aufnahme zwischen Gruppe A und B gefunden wurde.

Abb. 6 Aufnahme von α -Methylglucosid (α -MG) in die Leberzelle von Schafen , die entweder laktosereich (Gruppe A , siehe Tab. 3) oder laktosearm (Gruppe B , siehe Tab. 4) gefüttert worden waren.

α -MG - Konzentration des Mediums : 5 mM

$\bar{x} \pm s$: siehe Tab. 8

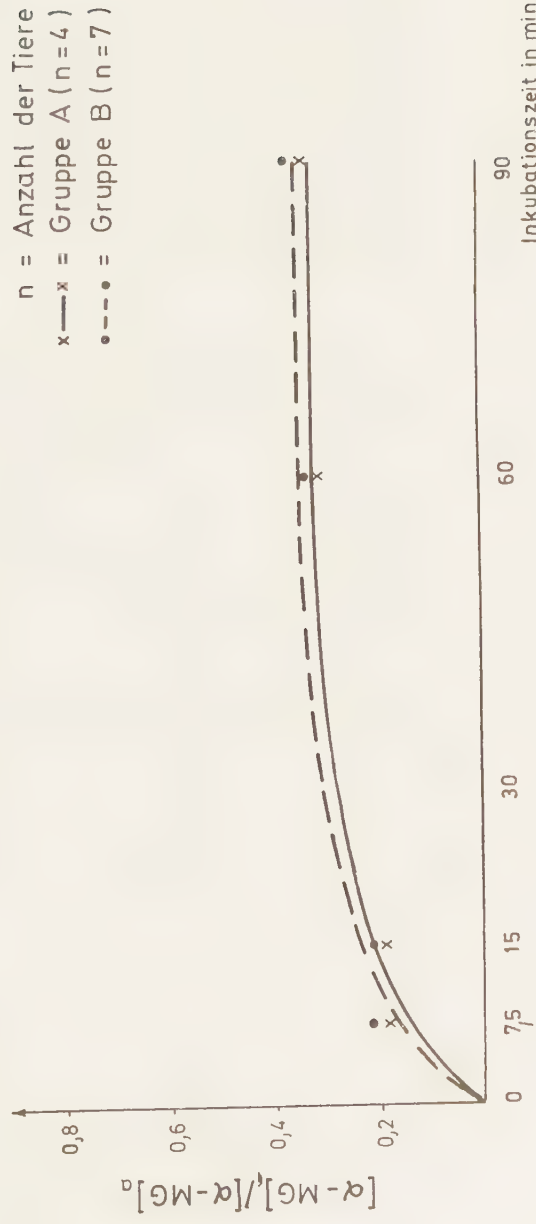
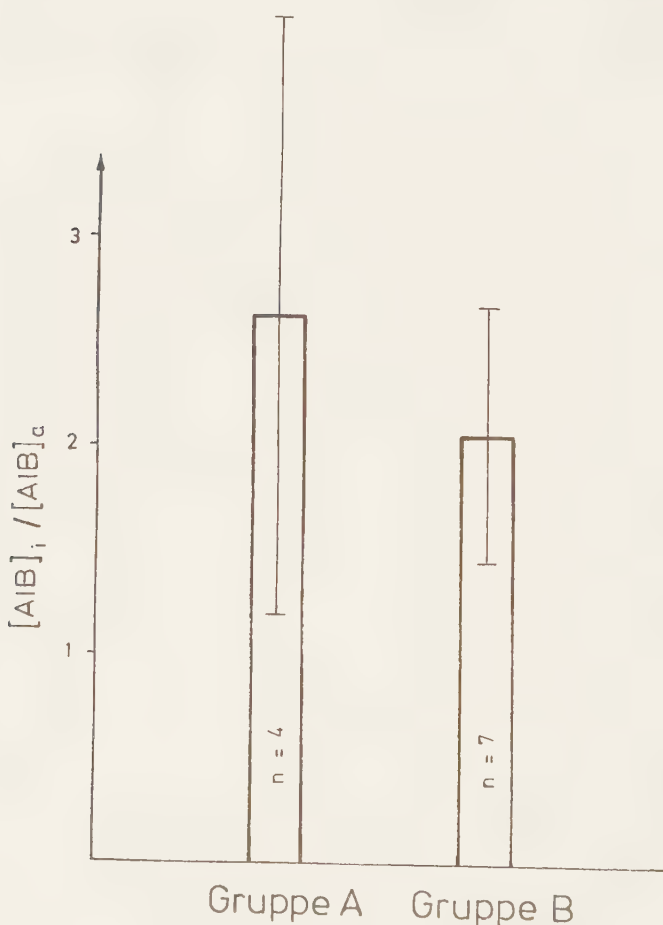


Abb.7 Aufnahme von AIB in die Leberzelle von Schafen, die entweder laktose-reich (Gruppe A, siehe Tab.3a) oder laktosearm (Gruppe B, siehe Tab.3b) gefüttert worden waren.

AIB -Konzentration des Inkubationsmedium : 1mM
Inkubationszeit : 60 min, n = Anzahl der Tiere



Versuchsreihe III

Aufnahme von Aminosäuren in die Leberzelle von Schafen und Lämmern mit fütterungsbedingt unterschiedlicher Vormagenentwicklung

Es wurde die Aufnahme von AIB unter dem Einfluß von Glukagon, Adrenalin und cyclischem 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP) in die Leberzelle von Lämmern (ca. 4 Monate alt) geprüft, deren Vormagenentwicklung infolge verlängerter MilCHFütterung gehemmt (M-Lämmer) bzw. infolge wiederkäuergerechter Fütterung physiologisch (HK-Lämmer) verlaufen war.

Um Alterseinflüsse untersuchen zu können, wurden zusätzlich entsprechende Untersuchungen an bis zu 7 Tagen alten Tieren durchgeführt. In Abb. 8 wird die Basal-Aufnahme von AIB in die Leberzelle von bis 7 Tage alten Lämmern sowie von M- und HK-Lämmern (ca. 4 Monate alt) dargestellt. Die jüngeren Lämmer zeigten eine wesentlich höhere AIB-Aufnahme in die Leberzelle als die älteren Lämmer. Ein Unterschied in der Aufnahme von AIB in die Abhängigkeit von der Vormagenentwicklung war nicht zu erkennen.

Um die Beeinflussung der AIB-Aufnahme durch Glukagon, Adrenalin und cAMP bei jüngeren und älteren Tieren vergleichen zu können, werden die Ergebnisse relativ dargestellt, wobei die AIB-Aufnahme der Kontrollen gleich 100 % gesetzt wurde.

Ein Einfluß von Glukagon auf die AIB-Aufnahme in die Leberzelle konnte bei keiner Tiergruppe registriert werden (Abb. 9 a). Bei Ratten hingegen erbrachten entsprechende Versuche einen deutlichen Effekt von Glukagon auf die AIB-Aufnahme (Abb. 9 b).

Auch Adrenalin zeigte keinen deutlichen Einfluß auf die AIB Aufnahme in die Leberzelle von Schafen (Abb. 9 c), wogegen in entsprechenden Versuchen an 2 Ratten ein positiver Adrenalineffekt (51,9 %) zu verzeichnen war.

Wie in Abb. 9 d dargestellt, ergab sich weder bei M- noch bei HK-Lämmern eine sichtliche Veränderung der AIB Aufnahme in die Leberzelle unter Einfluß von cAMP. Dagegen lagen bei vier Junglämmern die Werte der AIB Aufnahme unter cAMP Einfluß deutlich über den Kontrollen. In Vergleichsversuchen an 2 Ratten konnte ebenfalls ein entsprechender positiver cAMP-Effekt (43,3 %) nachgewiesen werden.

Wie aus Abb. 8 zu entnehmen war, erfolgt die Nettoaufnahme von AIB bei jungen Lämmern rascher als bei älteren Lämmern. Dies hängt möglicherweise mit der hohen Proteinansatzrate bei jungen Tieren zusammen. Da in Zellen rasch wachsender Gewebe Polyamine, insbesondere Spermidin, in hohen Konzentrationen vorkommen, und diese Stoffe mit der hohen Proteinsyntheserate in diesen Geweben kausal in Verbindung gebracht worden sind (84), haben wir auch den Einfluß von Spermidin auf die Aminosäureaufnahme in die Leberzelle bei Lämmern und Ratten untersucht. Aus Abb. 10 geht hervor, daß Spermidin die AIB Aufnahme in die Leberzelle unter unseren Versuchsbedingungen nicht zu beeinflussen scheint.

Abb.8 Aufnahme von AIB in die Leberzelle von Junglämmern (bis 7 Tage alt) und von mit Milch (M), bzw. zusätzlich mit Heu und Kraftfutter (HK) gefütterten Lämmern (ca. 4 Monate alt).

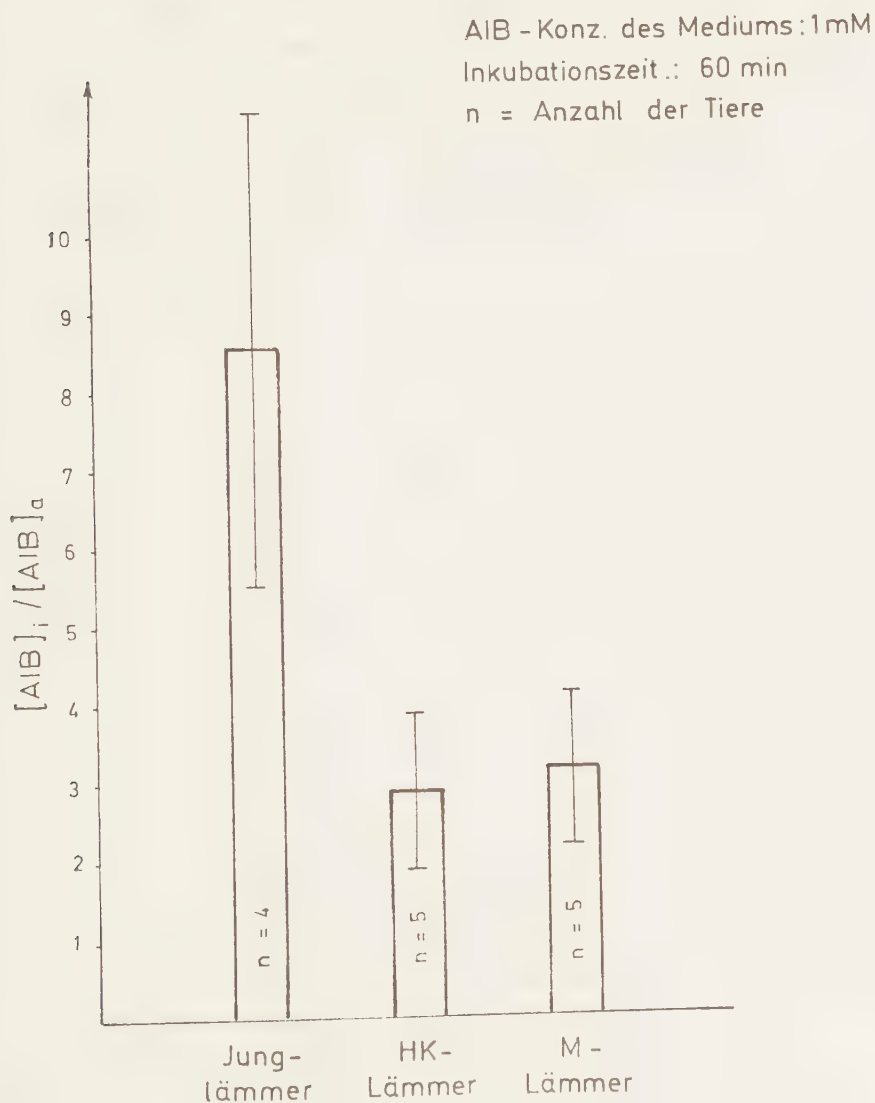


Abb.: 9a Einfluß von Glukagon (2,9 mM) auf die Aufnahme von AIB in die Leberzelle von Junglämmern (bis 7 Tage alt), sowie von mit Milch (M) bzw. zusätzlich mit Heu und Krafftfutter (HK) gefütterten Lämmern (ca. 4 Monate alt).

Absolutwerte der Kontrollen siehe Abb. 8

AIB - Konzentration des Mediums : 1 mM

Inkubationszeit : 60 min

--- = Kontrollen = 100 % ; n = Anzahl der Tiere

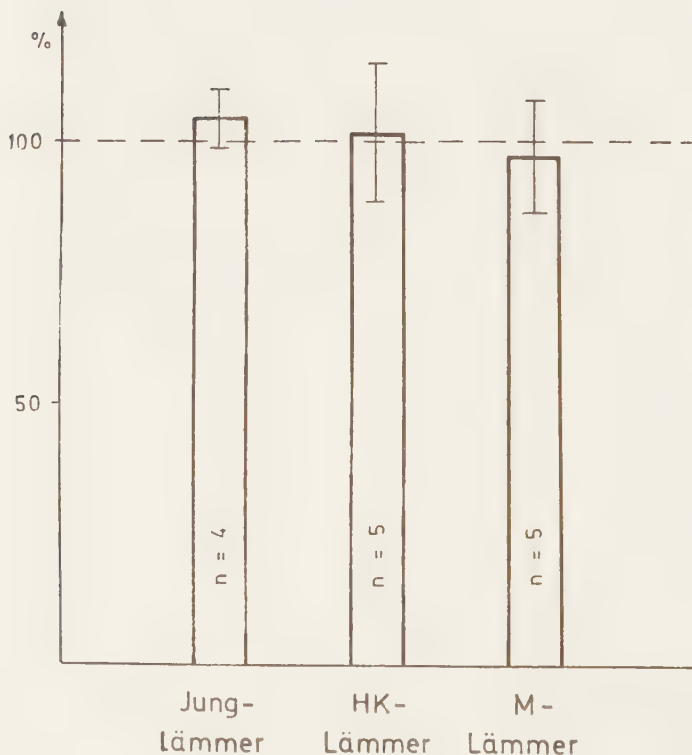


Abb.9b Einfluß von Glukagon (2,9 μ M) auf die Aufnahme von AIB in die Leberzelle von Ratten (19-30 Tage alt).

AIB Konzentration des Mediums : 1mM
Inkubationszeit : 60 min

n = Anzahl der Tiere

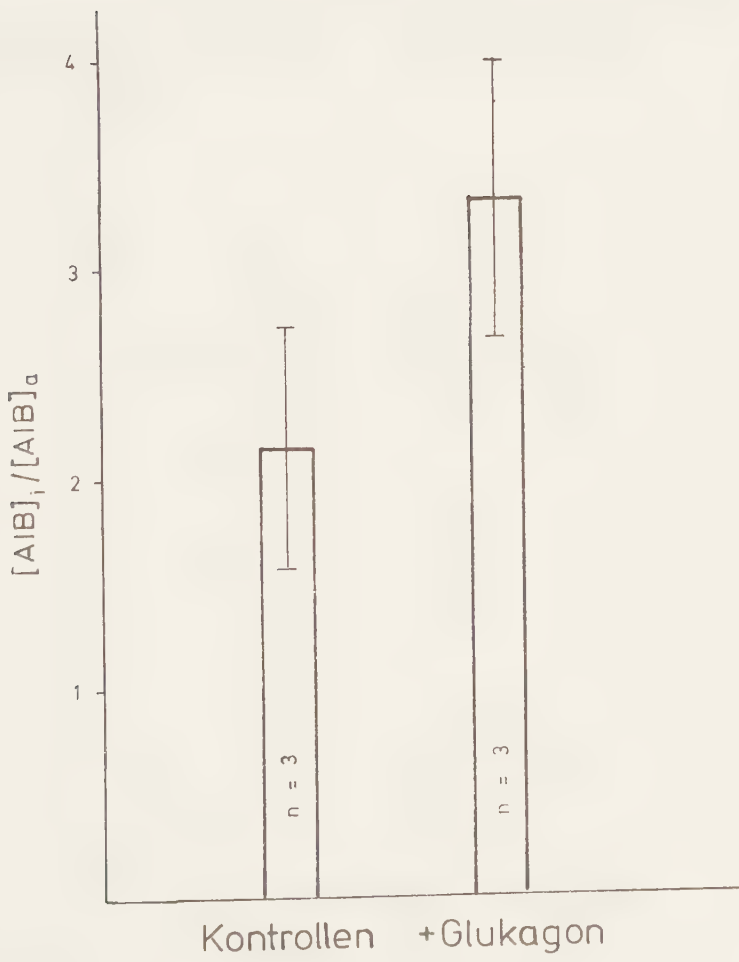


Abb.9c Einfluß von Adrenalin (0,01 mM) auf die Aufnahme von AIB in die Leberzelle von Junglämmern (bis 7 Tage alt) sowie von mit Milch (M) bzw. zusätzlich mit Heu und Kraftfutter (HK) gefütterten Lämmern (ca. 4 Monate alt).

Absolutwerte der Kontrolle s. Abb. 8

AIB - Konzentration des Mediums : 1 mM

Inkubationszeit : 60 min

— = Kontrollen = 100 % ; . n = Anzahl der Tiere

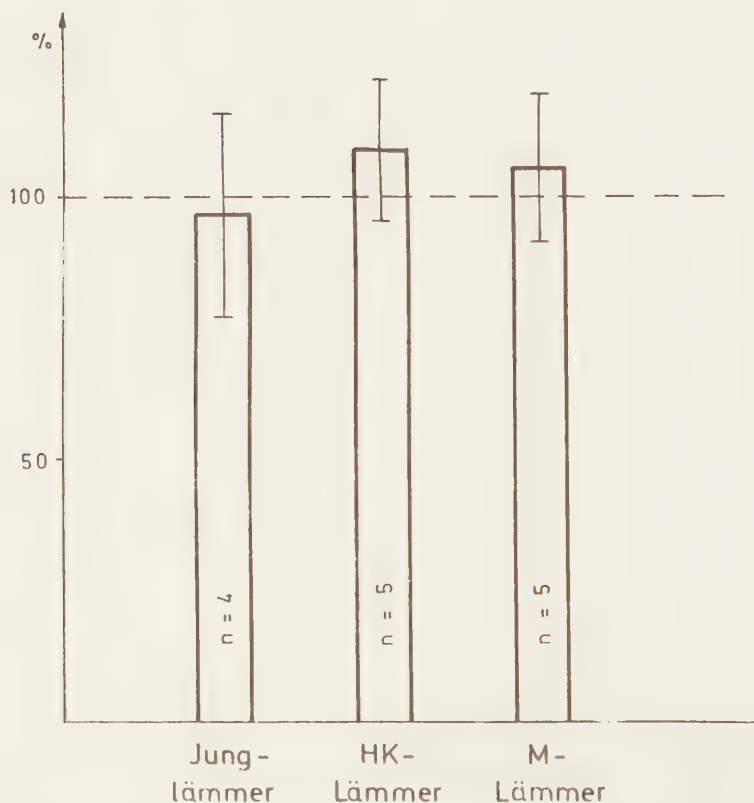


Abb.9 d. Einfluß von cyclischem Adenosinmono-
phosphat (1,0mM) auf die Aufnahme
von AIB in die Leberzelle von Jungläm-
mern (bis 7 Tage alt), sowie von mit (M)
Milch bzw zusätzlich mit Heu und (HK)
Kraftfutter gefütterten Lämmern (ca.
4 Mon. alt).

AIB - Konz. des Mediums : 1mM
Inkubationszeit : 120 min

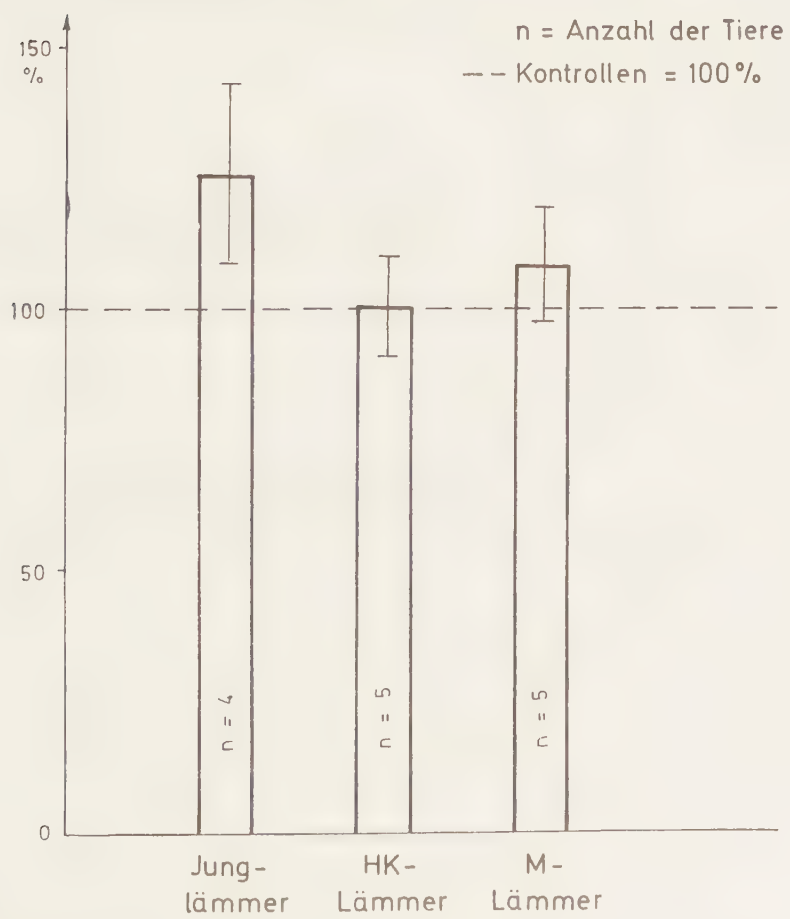
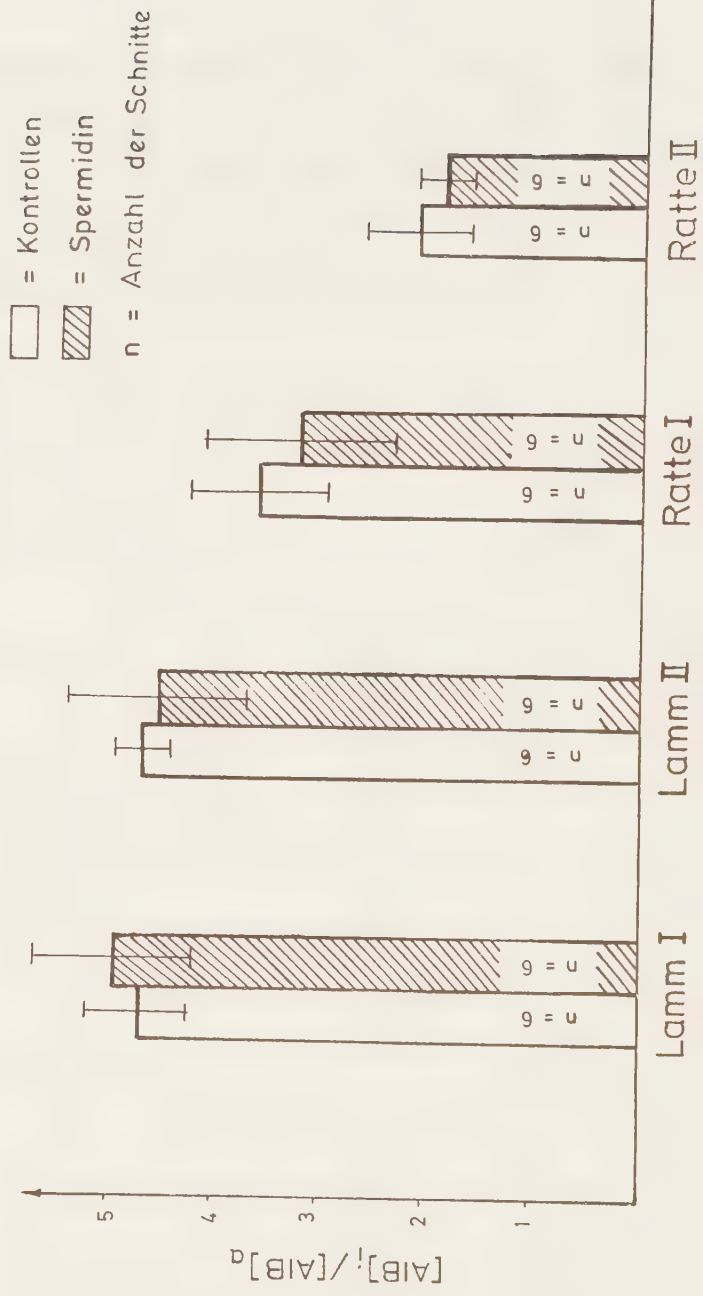


Abb.10 Einfluß von Spermidin (5 mM) auf die Aufnahme von AIB in die Leberzellen von 2 Lämmern (I: 2 Tage alt bzw. II: 7 Wochen alt) und 2 Ratten (I: 163 g bzw. II : 332 g).

AIB Konzentration des Mediums 1 mM ; Inkubationszeit : 60 Minuten ;



Diskussion

Es ist bekannt, daß Glucose und andere Monosaccharide bei der Ratte durch erleichterte Diffusion sehr rasch in die Leberzelle gelangen (15,31,40,59,60,89,103,104). Der Glucosestoffwechsel der Leberzelle wird daher nicht durch die Glucosepermeabilität der Zellmembran limitiert (31). Ob analoge Verhältnisse auch für Wiederkäuer gelten, war bislang nicht bekannt. Da sich der Kohlenhydratstoffwechsel des Wiederkäuers in mancherlei Hinsicht vom Kohlenhydratstoffwechsel des Monogastriers unterscheidet (siehe Einleitung), wurde daher in der vorliegenden Arbeit die Monosaccharidaufnahme in die Leberzelle bei Lämmern untersucht. Dabei wurde einem etwaigen Einfluß des Alters und der Vormagenentwicklung auf die Monosaccharidaufnahme in die Leberzelle besondere Beachtung geschenkt.

Als Transportsubstrate dienten Glucose, 3-O-Methylglucose, α -Methylglucosid und 2-Desoxyglucose. 3-O-Methylglucose und α -Methylglucosid werden im Gegensatz zu Glucose nicht metabolisiert (23,35,44,87), während 2-Desoxyglucose in der Zelle in geringem Umfang phosphoryliert wird (36). Glucose, 3-O-Methylglucose und 2-Desoxyglucose scheinen nach Untersuchungen an der Rattenleber durch den gleichen Transportmechanismus in die Leberzelle einzutreten (10,23,36). Für α -Methylglucosid ist dies noch nicht definitiv geklärt.

In unseren Untersuchungen an Leberschnitten von Lämmern konnte im Gegensatz zu den anderen genannten Zuckern für 3-O-Methylglucose so gut wie keine Aufnahme in die Leberzelle gemessen werden. Der Monosaccharidcarrier der Leberzellmembran scheint damit beim Lamm im Gegensatz zur Ratte, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe Affinität zu 3-O-Methylglucose zu haben.

Auch α -Methylglucosid wurde relativ langsam in die Leberzelle aufgenommen. Ein Gleichgewicht zwischen In- und Efflux wurde erst nach etwa 60 Minuten erreicht.

Für 2-Desoxyglucose war dies nach etwa 30 Minuten der Fall. Die Aufnahme von Glucose schien noch wesentlich rascher zu erfolgen.

Ein Einfluß von Alter, Fütterung und Vormagenentwicklung auf die Monosaccharidaufnahme in die Leberzelle konnte nicht nachgewiesen werden.

Als sehr interessant ist die Tatsache anzusehen, daß unter Gleichgewichtsbedingungen die intrazelluläre Konzentration aller untersuchter Zucker beim Lamm erheblich niedriger war als die extrazelluläre Konzentration. Für die Rattenleber trifft dies nicht zu. Ein analoger Befund wurde von Berthet et al. (12) für Glucose an Leberschnitten von Kaninchen erhoben. Eine befriedigende Erklärung kann derzeit für diesen Befund nicht gegeben werden. Es ist denkbar, daß ein erheblicher Teil des intrazellulären Wassers durch Kompartimentierung der Zelle für Monosaccharide nicht zugänglich ist. Auf diese Weise ließe sich der genannte Befund erklären.

Andererseits könnte diesem Befund auch ein von "innen nach außen" gerichteter Transport gegen ein Konzentrationsgefälle zugrunde liegen. Damit könnte die intrazelluläre Glucosekonzentration in der Leberzelle niedrig gehalten werden, wodurch z.B. die Gluconeogenese unter Umständen begünstigt werden könnte. In diesem Zusammenhang ist anzuführen, daß für den Rattenlymphozyten ähnliche Verhältnisse nachgewiesen wurden (35).

Zum Vergleich wurde außer der Monosaccharidaufnahme auch die Aminosäurenaufnahme in die Leberzelle bei Lämmern untersucht. Aminosäuren werden nicht wie Glucose und andere Hexosen durch erleichterte Diffusion, sondern durch aktiven Transport in die Leberzelle aufgenommen. Als Modellaminosäure diente für unsere Untersuchungen die nicht metabolisierbare α -Aminoisobuttersäure (AIB). AIB konkurriert mit bestimmten neutralen Aminosäuren, wie z.B. Glycin, Prolin, Alanin und Serin um die Aufnahme in die Zelle (20,99).

Wie den Ergebnissen der Versuche entnommen werden kann, akkumulierte die Leberzelle des jungen Lammes (bis 7 Tage alt) AIB in vitro gegen ein höheres Konzentrationsgefälle als die des älteren Lammes (ca. 4 Monate alt). Dieser Unterschied scheint mit der Vormagenentwicklung nicht in Zusammenhang zu stehen, da bei gleichaltrigen älteren Lämmern mit fütterungsbedingt unterschiedlicher Vormagenentwicklung kein nennenswerter Unterschied in der AIB-Aufnahme in die Leberzelle festzustellen war.

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Untersuchungen von Blatt (13), der allerdings eine sehr viel niedrigere Substratkonzentration verwendete. Tews und Harper (94) fanden an der Leberzelle der Ratte eine analoge Altersabhängigkeit. Worauf die altersbedingte Abnahme der Aminosäuretransportkapazität im einzelnen beruht, ist unbekannt. Es liegt aber nahe, den Rückgang

der AIB-Aufnahme in die Leberzelle mit dem mit fortschreitendem Alter sich verringernden Proteinansatzvermögen (73) in Verbindung zu bringen, zumal der Aminosäuretransport mit der Proteinsyntheserate korreliert zu sein scheint (1,64).

Da das die Proteinsynthese stimulierende Polyamin Spermidin bei jungen Tieren besonders in rasch wachsenden Organen in hoher Konzentration vorkommt, wurde geprüft, ob die Anwesenheit von Spermidin im Inkubationsmedium eine Stimulierung der AIB-Aufnahme in die Leberzelle zur Folge hat. Dabei konnte jedoch kein entsprechender Spermidin-Effekt nachgewiesen werden. Es stellt sich allerdings in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine Inkubationszeit von 120 Minuten für die Manifestation eines entsprechenden Effektes ausreicht. Eine längere Inkubation verbot sich, da unter diesen Umständen das Lebergewebe bereits erheblich geschädigt worden wäre.

Bei der Ratte stimulieren Glukagon, Adrenalin und cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat (cAMP) die Aminosäureaufnahme in die Leberzelle (95,96). Daher wurde in zusätzlichen Versuchen geprüft, ob beim Lamm analoge Verhältnisse zu verzeichnen sind. Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von Adrenalin und Glukagon im Inkubationsmedium, auch bei sehr langer Inkubation, bei Lämmern keine Steigerung der AIB-Aufnahme in die Leberzelle zur Folge hatte.

cAMP dagegen stimulierte bei neugeborenen Lämmern die AIB-Aufnahme in die Leberzelle, wogegen bei älteren Lämmern (3-4 Monate alt) kein entsprechender Effekt auftrat. Unter analogen Versuchsbedingungen konnte an Leberschnitten von erwachsenen Ratten eine Stimulierung der intrazellulären AIB Aufnahme durch Glukagon, cAMP und Adrenalin nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich ableiten, daß der Aminosäuretransport durch die Leberzellmembran beim Lamm entweder gegenüber den genannten Hormonen keine Sensitivität aufweist oder daß diese Hormone unter den gewählten Versuchsbedingungen vom Lebergewebe inaktiviert wurden. Zur Abklärung dieser Alternativmöglichkeit sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Der unterschiedliche Effekt von cAMP auf die AIB Aufnahme in die Leberzelle bei neugeborenen bzw. älteren Lämmern spricht für eine Abnahme der Sensitivität des Aminosäuretransportes in der Leber gegenüber cAMP mit fortschreitendem Alter. Allerdings könnte dafür auch ein Unterschied in der Permeabilität der Zellmembran für cAMP zwischen jungen und älteren Lämmern verantwortlich sein. Ein Unterschied in der Phosphodiesteraseaktivität zwischen beiden Tiergruppen bietet sich ebenfalls als Erklärungsmöglichkeit für den unterschiedlichen Effekt von cAMP auf die AIB Aufnahme in die Leberzelle bei jungen und älteren Lämmern an.

Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob die Monosaccharid- und Aminosäureaufnahme in die Leberzelle beim Lamm Veränderungen durch Alter, Vormagenentwicklung und Ernährung erfährt.

Die Untersuchungen wurden in vitro an Leberschnitten durchgeführt.

Der Verteilungsquotient der ^{14}C - markierten Substrate Glucose, 2-Desoxyglucose, 3-O-Methylglucose, α -Methylglucosid und α -Aminoisobuttersäure (AIB) zwischen der intrazellulären Flüssigkeit und dem Inkubationsmedium ($= [S]_i / [S]_a$) nach verschiedener Inkubationsdauer diente als Parameter zur Beurteilung der Substrataufnahme.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. 3-O-Methylglucose wurde von der Leberzelle des Lammes während einer 120 minütigen Inkubation nur minimal aufgenommen.
2. α -Methylglucosid, Glucose und 2-Desoxyglucose wurden in die Leberzelle der Lämmer aufgenommen. Die intrazelluläre Konzentration dieser Substrate war unter Gleichgewichtsbedingungen erheblich geringer als die extrazelluläre. Bei der Ratte gleicht sich dagegen die intrazelluläre Monosaccharidkonzentration rasch an die extrazelluläre Konzentration an.
Nach unseren Untersuchungen scheinen somit beim Wiederkäuer für die Aufnahme von Monosacchariden in die Leberzelle andere Verhältnisse zu herrschen als beim Monogastrier.
3. Eine Beeinflussung der Monosaccharidaufnahme durch Alter, Vormagenentwicklung und Ernährung war nicht nachweisbar.
4. Die AIB Aufnahme in die Leberzelle war beim jungen Lamm (bis 7 Tage alt) höher als beim älteren Lamm (3-4 Monate alt). Bei gleichaltrigen Tieren mit fütterungsbedingten Unterschieden in der Vormagenentwicklung ergab sich kein Unterschied bezüglich der AIB-Aufnahme in die Leberzelle.

5. Adrenalin und Glukagon zeigten im Gegensatz zu Befunden an der Ratte keinen Einfluß auf die AIB-Aufnahme in die Leberzelle des Lammes.
6. Cyclisches 3', 5' Adenosinmonophosphat förderte die AIB-Aufnahme in die Leberzelle des jungen Lammes (bis 7 Tage alt), während beim älteren Lamm (3-4 Monate alt) kein Einfluß festzustellen war.
7. Spermidin beeinflusste unter unseren Versuchsbedingungen die AIB-Aufnahme in die Leberzelle nicht.

Abstract

Influences of age, forestomach development and nutrition upon monosaccharide and amino acid uptakes by the liver cells of lambs were investigated.

The experiments were carried out in vitro employing liver slices.

Distribution ratios of the ^{14}C -labelled substrates glucose, 3-o-methylglucose, 2-deoxyglucose, α -methylglycosid and α -aminoisobutyric acid (AIB) between the intracellular fluid and the incubation medium ($= [\text{S}]_i / [\text{S}]_a$) at different incubation times was used as an index of substrate uptake.

The following results were obtained:

1. 3-o-methylglucose uptake by the lamb liver cells during a 120 min incubation was minimal.
2. α -methylglucosid, glucose and 2-deoxyglucose were taken up by lamb liver cells. The intracellular concentration of these substrates under steady state conditions was considerably lower than the extracellular concentration. In contrast, in rat liver cells the intracellular concentration increased rapidly to the extracellular level. These results indicate, that the uptake of monosaccharides by liver cells in the ruminant differs from that in monogastric animals.
3. Changes in age, forestomach development and nutrition were not observed to influence the monosaccharide uptake of sheep liver cells.
4. Uptake of AIB by liver cells of young lambs (up to 7 days) was greater than that of older lambs (3-4 months). Lambs fed only milk showed retarded forestomach development, but the uptake of AIB by the liver cells did not differ from that by liver cells of normal lambs of the same age.
5. In contrast to results with rats epinephrine and glucagon did not influence AIB uptake by lamb liver cells.

6. Cyclic 3, 5 adenosine monophosphate increased the uptake of AIB by liver cells of young lambs (up to 7 days) but did not influence the AIB uptake by liver cells of older lambs (3-4 months).
7. AIB uptake under our experimental conditions was not influenced by spermidin.

Literaturverzeichnis

1. Adolfson, S., A. Arvill, K. Ahren,
Stimulation by insulin of accumulation and
incorporation into protein of L-(H³)-proline
in the intact levator ani muscle from the
rat.
Biochim. Biophys. Acta 135, 176 (1967)
2. Annison, E.F., D.B. Lindsay, R.R. White,
Metabolic interrelations of glucose and
lactate in sheep.
Biochem. J. 88, 243 (1963)
3. Ballard, F.J., I.T. Oliver,
The effect of glucose phosphorylation and
incorporation into glycogen in the livers
of foetal and adult rats and sheep.
Biochem. J. 131, 131 (1964)
4. Ballard, F.J.,
Glucose utilisation in mammalian liver.
Comp. Biochem. Physiol. 14, 437 (1965)
5. Ballard, F.J., R.W. Hanson, D.S. Kronfeld,
Gluconeogenesis and lipogenesis in tissue
from ruminant and nonruminant animals.
Fed. Proc. 28, 218 (1969)
6. Baril, E.F., V.R. Potter,
Systematic oscillations of amino acid
transport in liver from rats adapted to
controlled feeding schedules.
J. Nutr. 95, 228 (1968)
7. Baril, E.F., V.R. Potter, H.P. Morris,
Amino acid transport in rat liver and
Morris hepatomas: effect of protein diet
and hormones on the uptake of α -aminoiso-
butyric acid - ¹⁴C.
Cancer Res. 29, 2101 (1969)
8. Barnabei, O., P. Lyly, V. Tomasi,
A study of the hormonal control in vitro
of Na⁺K⁺ activated ATPase.
Adv. Enzyme Reg. 11, 539 (1973)

9. Basset, J.M.,
The influence of cortisol on food intake and
glucose metabolism in sheep.
J. Endocrin. 26, 539 (1963)
10. Bauer, H., H.W. Heldt,
Glucosetransport über die Plasmamembran
isolierter Hepatozyten.
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chemie 357, 249 (1976)
11. Bergmann, R.N., R.J. Bucolo,
Interaction of insulin and glucose in the
control of hepatic glucose balance.
Am. J. Physiol. 227, 1314 (1974)
12. Berthet, J., P.Jacques, H.G. Hers, C. De Duve,
Influence de l'Insuline et du Glukagon sur
la Synthèse du Glycogène Hepatique.
Biochim. Biophys. Acta 20, 190 (1956)
13. Blatt, J.,
Untersuchungen zur Regulation der Amino-
säureaufnahme in die Leber- und Muskel-
zelle bei Lämmern und Schafen.
Vet. Med. Diss. München (1975)
14. Butcher, R.W., G.A. Robinson, E.W. Sutherland,
Cyclic AMP and hormon action.
Biochemical actions of Hormones II.
Ed. by G. Litwack
Acad. Press, New York and London, (1972)
15. Cahill, G.F., J. Ashmore, A.S. Earle, S. Zottu,
Glucose penetration into liver.
Am. J. Physiol. 192, 491 (1958)
16. Chambers, J.W., R.H. Georg, A.D. Bass,
Effect of hydrocortisone and insulin on
uptake of α -aminoisobutyric acid by iso-
lated perfused rat liver.
Mol. Pharmacol. 1, 66 (1965)
17. Christensen, H.N., A. J. Streicher,
Association between rapid growth and elevated
cell concentration of amino acids.
J. Biol. Chem. 175, 95 (1948)

18. Christensen, H.N., J.B. Clifford,
Early postnatal intensification of hepatic
accumulation of amino acids.
J. Biol. Chemistry 238, 1748 (1963)
19. Christensen, H.N.,
Free amino acids and peptides in tissues in
"Mammalian protein metabolism", Vol. I, p. 105
ed. by H.H. Munro
Acad. Press New York (1964)
20. Christensen, H.N., M. Liang, E.G. Archer,
A distinct Na⁺requiring transport system
for alanin, serin, cystin and similar amino
acids.
J. Biol. Chem. 242, 5237 (1967)
21. Christensen, H.N.,
On the development of amino acid transport
system.
Fed. Proc. 32, 19 (1973)
22. Colombini, M., R.M. Johnstone,
Na⁺-gradient - stimulated AIB transport
in membrane vesicles from Ehrlich ascites
cells.
J. Membrane Biol. 18, 315 (1974)
23. Crawhall, J.C., S. Segal,
Transport of some amino acids and sugars
in rat liver slices.
Biochim. Biophys. Acta 163, 163 (1968)
24. Crawhall, J.C., M.G. Davis,
Further studies of the transport of amino
acids in rat liver slices.
Biochim. Biophys. Acta 225, 326 (1971)
25. Crawhall, J.C., P. Purkiss,
Transport of methionine and proline by rat
liver slices and the effect of certain
hormones.
Biochem. J. 136, 15 (1973)
26. Crofford, O.B., A.E. Renold,
Glucose uptake by incubated rat epididymal
adipose tissue.
J. Biol. Chem. 240, 14 (1965)

27. Csaky, T.Z., J.E. Glenn,
Distribution of 3-methyl-glucose in organs
of rat.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 98, 400 (1958)
28. Danielli, J.F.,
The present position in the field of
facilitated diffusion and selective active
transport.
in "Recent Developments in Cell Pysiology",
ed. by J.A. Kitching, Butterworth Scient.,
Publ. London, p. 1 (1954)
29. Dunand, B., L. Blondel, L. Gierardier, B. Jeanrenand,
 α -aminoisobutyric acid uptake by cultured
heart cells.
Biochim. Biophys. Acta 255, 462 (1972)
30. Edwards, A.V.,
Carbohydrate metabolism in young animals.
in "Physiology of digestion and metabolism
in the ruminant",
ed. by A.T. Philipson,
Oriel Press, New Castle upon Tyne, p.180 (1970)
31. Elbrink, J., J. Bihler,
Membrane transport: its relation to cellular
metabolic rates. Glucose transport into
animal cells is adapted to their metabolic
rate and often controls rates of glucose
use.
Science 188, 1177 (1975)
32. Elsas, L.J., I. Albrecht, L.E. Rosenberg,
Insulin stimulation of amino acid uptake
in rat diaphragm.
J. Biol. Chem. 243, 1846 (1968)
33. Elshove, A., G.D.V. van Rossum,
Net movements of sodium and potassium and
their relation to respiration, in slices
of rat liver incubated in vitro.
J. Physiol. 168, 531 (1963)
34. Emmelot, P., C.J. Bos,
Adenosintriphosphatase in the cell membrane
fraction from rat liver.
Biochim. Biophys. Acta 58, 374 (1962)

35. Feldmann, M.J., R.A. Kraetsch, M.A. Lichtman, W.A. Peck,
Uptake of 3-o-methyl-¹⁴C-D-glucose by rat
thymic lymphocytes: insensitivity to cortisol
and inhibitors of ribonucleic acid and pro-
tein synthesis, and sensitivity to
cytochalasin B.
J. Reticuloendoth. Soc. 16, 6 (1974)
36. Fishman, R.A., M. Reiner,
Failure of hydrocortisone to alter the
transport of hexoses into rat brain and
other tissues.
J. Neurochem. 19, 2221 (1972)
37. Fricke, R., C.M. Clark,
Augmentation of glucose and amino acid
transport in the developing rat diaphragm.
Am. J. Physiol. 224, 117 (1973)
38. Fuller, R.W., J.C. Baker,
Effects of glucagon and cAMP on the tissue
distribution of ¹⁴C- α -aminoisobutyric
acids in rats.
FEBS Letters 53, 8 (1975)
39. Goodwin, R.F.W.,
Blood sugar in foetal and neonatal mammals.
Nature 173, 777 (1954)
40. Goresky, C.A.,
The entry of glucose into liver cells.
J. Clin. Invest. 46, 1062 (1967)
41. Goresky, C.A., B.E. Nadeau,
Uptake of materials by the intact liver.
The exchange of glucose across cell membranes.
J. Clin. Invest. 53, 643 (1974)
42. Heinz, E., P.M. Walsh,
Exchange diffusion, transport and intra-
cellular level of amino acids in Ehrlich
ascites carcinoma cells.
J. Biol. Chem. 233, 1488 (1957)
43. Heinz, E.,
Transport through biological membranes.
Annual Rev. Physiol. 29, 21 (1967)

44. Hetenyi, G.jr., F.K. Kopstick, L.J. Retelstorf,
The effect of insulin on the distribution
of glucose between the blood plasma and
the liver in alloxan-diabetic and adrenal-
ectomized rats.
Can. J. Biochem. Physiol. 41, 2431 (1963)
45. Hetenyi, G.jr., D. Studney,
The distribution of glucose and methyl-
glucose between the liver and plasma in
normal and insulin injected rats.
Experientia 23, 219 (1966)
46. Hetenyi, G.jr., K.H. Norwich, D.R. Studney, J.D. Hall,
The exchange of glucose across the liver
cell membrane.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 47, 361 (1969)
47. House, W.A., R.W. Phillips,
Changes in glucose metabolism during post-
natal development of the lamb.
Fed. Proc. 27, 557 (1968)
48. Hüntemann, H.,
Untersuchungen über die Monosaccharid- und
Aminosäureaufnahme in die Muskelzelle und
den Erythrozyten bei Lämmern.
Med. Vet. Diss. München (1976)
49. Jacquez, J.A., J.A. Schäfer,
Na⁺ and K⁺ electrochemical potential gradients
and the transport of α -aminoisobutyric acid
in Ehrlich ascites tumor cells.
Biochim. Biophys. Acta 193, 368 (1969)
50. Jarret, J.G., B.J. Potter,
Carbohydrate metabolism in the young lamb.
Austr. J. Exptl. Biol. 30, 207 (1952)
51. Jarret, J.G. B.J. Potter,
Insulin tolerance and hypoglycaemic
convulsions in sheep.
Austr. J. Exptl. Biol. 31, 311 (1953)
52. Jarret, J.G., B.J. Potter, G.B. Jones,
Changes in glucose utilisation during
development of the lamb.
Biochem. J. 189, (1964)

53. Johnstone, R.M., P.G. Scholefield,
The need for ions during transport and
exchange diffusion of amino acids into
Ehrlich ascites carcinoma cells.
Biochim. Biophys. Acta 94, 130 (1965)
54. Kronfeld, D.S., M.G. Simesen,
Glucose biokinetics in sheep.
Am. J. Physiol. 201, 639 (1961)
55. Landau, B.R., J.R. Leonards, F.M. Barry,
Regulation of blood glucose concentration:
response of liver to glucose administration.
Am. J. Physiol. 201, 41 (1961)
56. Landes, C.,
Untersuchungen über den renalen Aminosäuren-
transport beim Lamm.
Med. Vet. Diss. München 1975
57. Lardy, H.A., V. Paetkau, P. Walter,
Paths of carbon in gluconeogenesis and
lipogenesis: The role of mitochondria in
supplying precursors of phosphoenolpyruvate.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53, 1410 (1965)
58. Leat, W.M.F.,
Carbohydrate and lipid metabolism in the
ruminant during post-natal development.
in "Physiology of digestion and metabolism
in the ruminant".
Ed. by A.T. Phillipson, Oriel Press,
Newcastle upon Tyne, p. 211 (1970)
59. Le Fevre, P.G., J.K. Marshall,
Conformational specificity in a biological
sugar transport system.
Am. J. Physiol. 194, 333 (1958)
60. Le Fevre, P.G.,
Sugar transport in the red blood cell;
structure activity relationships in
substrates and antagonists.
Pharm. Rev. 13, 39 (1961)
61. Lindsay, D.B., I.G. Garret, J.L. Mangan, J.T. Lindsell,
Utilisation of amino acids by the isolated
perfused sheep liver.
J. Physiol. 60, 141 (1975)

62. Macknight, A.D.C., J.P. Pilgrim, B.A. Robinson,
The regulation of cellular volume in liver
slices.
J. Physiol. 238, 279 (1974)
63. Malette, L.E., J.H. Exton, C.R. Park,
Effects of glucagon on amino acid transport
and utilisation in the perfused rat liver.
J. Biol. Chem. 244, 5724 (1969)
64. Manchester, K.L.,
The control by insulin of amino acid
incorporation in muscle.
Biochem. J. 117, 457 (1970)
65. Manns, J.G., J.M. Boda,
Insulin release by acetate, propionate, butyrate
and glucose in lambs and adult sheep.
Am. J. Physiol. 212, 747 (1967)
66. Maqsood, S., P.T. Iype,
Studies of the uptake of 2-deoxy-D-glucose
in normal and malignant rat epithelial
liver cells in culture.
Int. J. Cancer 15, 773 (1975)
67. Masakazu, H.,
Transport of sugars in tumor cells membranes.
Biochim. Biophys. Acta 355, 77 (1974)
68. McCandless, E.L., J.A. Dye,
Physiological changes in intermediary
metabolism of various species of ruminants
incident to functional development of the rumen.
Am. J. Physiol. 162, 434 (1950)
66. McCarthy, R.D., E.M. Kesler,
Relation between age of calf, blood glucose,
blood and rumen levels of volatile fatty
acids and in vitro cellulose digestion.
J. Dairy Sci. 39, 1280 (1956)
70. Müller, L.L., D.W. John, P.F. Cloutier,
Einige neuere Beobachtungen über den Amino-
säuren- und Proteinstoffwechsel in der iso-
liert perfundierten Leber.
in W. Staib und R. Scholz "Der Stoffwechsel
der isolierten perfundierten Leber"
Springer Verlag, Berlin (1968)

71. Morgan, H.E., C.F. Calman, R.C. Post, C.R. Park,
Kinetics of glucose transport across cell membran.
Fed. Proc. 14, 103 (1955)
72. Morgan, H.E., P.J. Randle, D.M. Regen,
Regulation of glucose uptake by muscle.
The effect of insulin, anaemia, salicylate,
and 2,4 dinitrophenol on membrane transport
and intracellular phosphorylation of glucose
in the isolated rat heart.
Biochem. J. 73, 573 (1959)
73. Munro, H.N.,
Mammalian protein metabolism.
Vol. III, Academic Press New York, London,
p. 185 (1969)
74. Nallathambi, S.A., A.M. Corvin, S.A. Adibi,
Hepatic and skeletal muscle transport of
cycloleucine during starvation.
Am. J. Physiol. 223, 13 (1972)
75. Oja, S.S., A.J. Uusitalo, M.L. Vahveleinen, R.S. Pika,
Changes in the cerebral and hepatic amino acids,
in the rat and guinea pig during development.
Brain Res. 11, 655 (1968)
76. Orloff, J., J. Handler,
The role of adenosine 3', 5' phosphate in the
action of antidiuretic hormone.
Am. J. Med. 42, 757 (1967)
77. Oxeneder, D.L., H.N. Christensen,
Distinct mediating systems for the transport
of neutral amino acids by the Ehrlich cell.
J. Biol. Chem. 238, 3686 (1963)
78. Pardridge, W.M., L.S. Jefferson,
Liver uptake of amino acids and carbohydrates
during a single circulatory passage.
Am. J. Physiol. 228, 4 (1975)
79. Reid, R.L.,
Studies on the carbohydrate metabolism of sheep.
III. The blood glucose during insulin
hypoglycaemia.
Austr. J. Agric. Res. 2, 132 (1951)

80. Renner, E.D., P.G.W. Plagemann, R.W. Bernloher,
Permeation of glucose by simple and facilitated
diffusion by Novikoff hepatoma cells in sus-
pension culture and its relationship to glucose
metabolism.
J. Biol. Chem. 247, 5767 (1972)
81. Riggs, T.R., K.J. McKirahan,
Action of insulin on transport of l-ala-
nine into rat diaphragm in vitro. Evidence, that
the hormone affects only one amino acid transport
system.
J. Biol. Chem. 248, 6450 (1973)
82. Risser, W.L., T.D. Gelehrter,
Hormonal modulation of amino acid transport
in rat hepatoma cells in tissue culture.
J. Biol. Chem. 248, 1248 (1973)
83. Rosenberg, L., S. Downing, S. Segal,
Extracellular space estimation in rat kidney
slices using ^{14}C saccharides and phlorizin.
Am. J. Physiol. 202, 800 (1962)
84. Russel, D.H.,
Polyamines in growth - normal and neoplastic in
"Polyamines in normal and neoplastic growth"
ed. by D.H. Russel, Raven Press, New York (1973)
85. Ryan, W.L., M.J. Carver,
Free amino acids of human foetal and adult
liver.
Nature 212, 292 (1966)
86. Sanders, R.B., T.R. Riggs,
Modification by insulin of the distribution of
two model amino acids in the rat.
Endocrin. 80, 29 (1967)
87. Sanders, R.B., V. Sagur,
Effects of epinephrin and L-tryptophan on
3-o-methyl glucose transport into the tissues
of the rat, in vivo and in vitro.
Pharmacol 11, 170 (1974)
88. Segal, S.,
Nonparametric statistics for the behavioral sciences.
McGraw-Hill Book Comp. Inc. New York (1956)

89. Stein, W.D.,
Facilitated diffusion - the kinetic analysis in
"The movement of molecules across Cell Membranes".
Academic Press, New York p. 126 (1967)
90. Stern, J.S., C.A. Baile, J. Mayer,
Are propionate and butyrate physiological
regulators of plasma insulin in ruminants.
Am. J. Physiol. 219, 84 (1970)
91. Stern, J.S., C. Baile, J. Mayer,
Growth hormone, insulin and glucose in suckling,
weanling and mature ruminants.
J. Dairy Sci. 54, 1052 (1971)
92. Stone, A.J.,
A proposed model for Na^+ Pump.
Biochim. Biophys. Acta 150, 578 (1968)
93. Tews, J.K., A.E. Harper,
Transport of nonmetabolizable amino acids
in rat liver slices.
Biochim. Biophys. Acta 183, 601 (1969)
94. Tews, J.K., A.E. Harper,
Amino acid transport in rat liver slices
during development.
Biochim. Biophys. Acta 183, 635 (1969)
95. Tews, J.K., N.A. Woodcock, A.E. Harper,
Stimulation of amino acid transport in rat liver
slices by epinephrine, glucagon and adenosine
3', 5' monophosphate.
J. Biol. Chem. 245, 3026 (1970)
96. Tews, J.K., N.A. Woodcock, A.E. Harper,
Effect of protein intake on amino acid transport
and adenosine 3', 5' monophosphate content in
rat liver.
J. Nutr. 102, 409 (1972)
97. Tews, J.K., N.A. Woodcock Colosi, A.E. Harper,
Amino acid transport and turnover of a transport
system in liver slices from rats treated with
glucagon and antibiotics.
Life Sci. 16, 739 (1975)

98. Tews, J.K., N.A. Woodcock Colosi, A.E. Harper,
Effect of amino acid meals on hepatic
 α -aminoisobutyric acid transport and
cyclic AMP.
Am. J. Physiol. 228, 1606 (1975)
99. Thomas, E.L., H.N. Christensen,
Indications of spatial relations among
structures recognizing amino acids and
 Na^+ at a transport receptor side.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 40, 277 (1970)
100. Thurston, J.H., R.W. Pierce,
Increase of glucose and high energy phos-
phate reserve in the brain after hydrocorti-
sone.
J. Neurochem. 16, 107 (1969)
101. Wheeler, K.P., Y. Inui, P.F. Hollenberg, E. Eavenson,
H.N. Christensen,
Relation of amino acid transport to sodium
ion concentration.
Biochim. Biophys. Acta 109, 620 (1965)
102. Widdas, W.F.,
Inability of diffusion to account for placen-
tal glucose transfer in the sheep and consi-
deration of the kinetics of a possible
carrier transfer.
J. Physiol. 118, 23 (1952)
103. Widdas, W.F.,
Facilitated transfer of hexoses across the
human erythrocyte membrane.
J. Physiol. 125, 163 (1954)
104. Williams, I.F., J.H. Exton, C.R. Park, D.M. Regen,
Stereospecific transport of glucose in the
perfused rat liver.
Am. J. Physiol. 215, 1200 (1968)
105. Young, J.W., E.O. Otchere, A. Trenkle, N.L. Jakobsen,
Effect of age, blood sugars and plasma
insulin in blood of milk-fed calves.
J. Nutr. 100, 1267 (1970)

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozenten Dr. Erwin Scharrer für die Überlassung des Themas, für seine jederzeit gewährte freundliche Unterstützung und für die zahlreichen Anregungen bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Diese Arbeit ist im Sonderforschungsbereich 147 - Jungtierkunde München - entstanden.

Lebenslauf

21.5.1950	geboren in Pressath/Opf. Vater : Franz Promberger, Oberforstmeister Mutter : Martina Promberger, geb. Langenberger
1956-1960	Volksschule München Forstenried
1960-1962	Ludwigsgymnasium München
1962-1969	Gymnasium Weilheim
1969	Abitur
1969-1975	Studium der Tiermedizin in München
20.3.1975	Bestallung als Tierarzt
seit April	1975 als Doktorand, seit 1.1.1976 als Verwalter der Dienstgeschäfte eines wiss. Assistenten am Institut für Tierphysiologie der Universität München tätig.

